



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO RETROSPECTIVO SOBRE AGENTES DE MASTITES E SUA SENSIBILIDADE A
ANTIMICROBIANOS EM EXPLORAÇÕES DE MONTEMOR-O-VELHO

JOANA FONSECA DA SILVA VIEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo Vilela

Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima

Doutor George Thomas Stilwell

Dr. Luís Manuel Gameiro Gome

ORIENTADOR

Dr. Luís Manuel Gameiro Gomes

CO-ORIENTADOR

Doutor George Thomas Stilwell

2010

LISBOA

Agradecimentos

Às explorações Adérito e Angelina, Exploração Agrícola Lda.; Montagri – Sociedade Agro Pecuária, Lda. e Agro-Seixido Sociedade Agrícola Lda., pela disponibilização dos dados que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Luís Gomes e à Dr.^a Elsa Monteiro Grillo por tudo o que me ensinaram, pela amizade, boa disposição e verdadeiro profissionalismo que jamais esquecerei e por me terem feito sempre sentir em casa.

À Dr.^a Maria João Seco pela amizade e por todas as “dicas” que me deu.

Ao Professor Doutor George Stilwell pela disponibilidade, transmissão de conhecimentos e excelente orientação que foram fundamentais para a elaboração desta dissertação.

Ao Professor Doutor Miguel Saraiva Lima pelos artigos que me forneceu e que foram bastante úteis para este trabalho.

A todos os professores da FMV pelos conhecimentos que me souberam transmitir ao longo destes seis anos.

À minha família, em especial aos meus pais por tudo o que sempre me deram, por todos os sonhos que me realizaram, por me terem transformado na pessoa que sou hoje e por terem acreditado sempre em mim. Nada teria sido tão fácil sem o apoio deles.

Ao meu irmão pela amizade, pelo companheirismo e pelo exemplo que sempre foi para mim. Para além de tudo isso, pela ajuda fundamental que me deu no tratamento estatístico deste trabalho.

Aos meus amigos de sempre e àqueles que foram surgindo nestes últimos seis anos, por todos os bons momentos que passámos juntos, pela amizade e pelo apoio que sempre me deram.

À Cláudia, à Marta, à Inês, à Ana Sofia e à Lena por tantas horas que passámos juntas e pela amizade que se criou.

À Catarina, à Alexandra, à Ana Maria e à Joana Santos pela amizade que cresceu nestes últimos anos e pela paciência que tiveram em me aturar durante estes tempos de elaboração da dissertação.

À Caty pelo seu coração enorme, por ser aquela amiga que está sempre presente, esteja onde estiver, e por ter sempre palavras de conforto em todos os momentos.

À Joana Fernades por ter estado tão presente nestes últimos 6 anos, pela amizade que cresceu durante estes anos e por tantas horas que passámos juntas a fazer exames.

À Rita pela companhia durante o estágio.

À Joana Santos pela amizade e paciência que teve em ler toda a minha tese.

À Márcia não só pela amizade, mas também pela companhia imprescindível durante o estágio e durante a realização desta dissertação e pela troca de experiências que são sempre um bom método de enriquecimento de conhecimentos. É sempre bom ter a certeza que há amigos que irão ficar para a vida.

A todos os meus animais, aos que fizeram e aos que continuam a fazer parte da minha vida, por tudo o que sempre me deram, por tudo o que me ensinaram e por me terem feito ver desde tão cedo que era esta a profissão onde me iria sentir realizada.

Estudo retrospectivo sobre agentes de mastites e sua sensibilidade a antimicrobianos em explorações de Montemor-o-Velho

Resumo

As mastites constituem uma das principais causas de perdas económicas nas explorações leiteiras, permanecendo como a razão mais frequente para a utilização de antimicrobianos. Deste modo o conhecimento dos agentes etiológicos e da sua sensibilidade aos antibióticos, numa determinada região, torna-se essencial para o desenvolvimento deste sector. No presente trabalho foi avaliada a prevalência dos diferentes agentes bacterianos isolados no leite de vacas provenientes de três explorações leiteiras e a sensibilidade de alguns agentes a 19 agentes antimicrobianos. Os agentes com maiores prevalências foram *Corynebacterium* spp. (23,2%), coliformes que não *E. coli* (11,6%) e *Staphylococcus* coagulase negativo (7,9%). Verificou-se que os agentes considerados maiores apenas correspondiam a 29,3% dos agentes isolados. Dos isolados testados, os *Enterococcus* spp. e os coliformes foram os que apresentaram maiores resistências aos antimicrobianos. Em termos de antibióticos, os β -lactâmicos foram aqueles aos quais os agentes apresentaram mais resistências, seguindo-se os macrólidos. As cefalosporinas de 2ª e 3ª geração foram as que apresentaram maior eficácia. De uma forma global, as resistências encontradas estavam de acordo com resultados de outros estudos. No caso dos isolados de *Staphylococcus aureus* observou-se um menor nível de resistências, o que pode ser um bom indício quanto ao uso correcto de antibioterapia por parte das explorações analisadas. Ao nível das prevalências, os resultados obtidos sugerem uma boa aplicação dos programas de controlo de mastites nas explorações analisadas.

Palavras-chave: bovinos leiteiros, mastites, prevalências, resistências a antimicrobianos

Retrospective study about mastitis agents and its sensibility to antimicrobials in Montemor-o-Velho dairy farms

Abstract

Mastitis are one of the main causes for the economic losses in dairy farms, being the most frequent reason for the use of antimicrobials. In this way, all information on the etiologic agents and their sensitivity to antibiotics in a regional scale is crucial for the development of this sector. This study assessed the prevalence of isolated microorganisms and their susceptibility to 19 antimicrobials in three dairy farms situated in Montemor-o-Velho. The most prevalence isolated microorganisms were *Corynebacterium* spp. (23.2%), coliforms non-*E. coli* (11.6%) e o negative coagulase *Staphylococcus* (7.9%). Major mastitis pathogens represented only 29.3% of the isolated agents. From the tested bacterial isolateds, *Enterococcus* spp. and coliforms showed highest levels of resistances. In terms of antibiotics β -lactams were the ones which demonstrated more resistances, followed by macrolides. Second and third generation cephalosporins presented the highest efficacy level. Globally, the resistances found in this study were similar to previous published works, except for *Staphylococcus aureus*' strains which had significantly lower antimicrobial resistance' incidence. This can be the result of good antibiotherapy practices on the dairy farms analysed. In what concerns to prevalence, the results suggests a correct application of mastitis control programs in these dairy farms.

Key words: dairy cattle, mastitis, prevalence, antimicrobial resistance

Índice

Lista de gráficos	ix
Lista de figuras.....	ix
Abreviaturas	x
1. Introdução	1
2. Relatório de estágio.....	1
2.1. Nota introdutória.....	1
2.2. Descrição das actividades.....	2
3. Revisão Bibliográfica	5
3.1. Anatomia e fisiologia da glândula mamária.....	5
3.2. Mecanismos de defesa da glândula mamária	6
3.2.1. Pele dos tetos.....	6
3.2.2. Canal do teto	6
3.2.3. Lactoferrina.....	7
3.2.4. Lactoperoxidade	7
3.2.5. Lisozimas	8
3.2.6. Complemento	8
3.2.7. Citoquinas	8
3.2.8. Imunoglobulinas.....	8
3.2.9. Leucócitos	9
3.2.10. Neutrófilos	9
3.3. A mastite bovina.....	9
3.4. Impacto económico das mastites.....	10
3.5. Factores predisponentes.....	11
Factores de risco individuais	11
Factores ambientais.....	16
Manejo e higiene da ordenha.....	19
3.6. Causas infecciosas	25
3.6.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	26
3.6.2. <i>Streptococcus agalactiae</i>	29
3.6.3. <i>Mycoplasma</i>	31
3.6.4. <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	33
3.6.5. <i>Corynebacterium bovis</i>	34
3.6.6. Coliformes.....	35
3.6.7. <i>Pseudomonas</i>	39

3.6.8. <i>Proteus</i>	39
3.6.9. <i>Pasteurella</i>	39
3.6.10. <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos (SCN)	39
3.6.11. <i>Streptococcus uberis</i>	41
3.6.12. <i>Salmonella</i>	42
3.6.13. <i>Arcanobacterium pyogenes</i>	42
3.6.14. <i>Bacillus</i> spp.	43
3.6.15. Leveduras	43
3.6.16. <i>Prototheca</i>	44
3.6.17. <i>Leptospira hardjo</i>	45
3.6.18. <i>Nocardia</i> spp.	45
3.6.19. <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	46
3.6.20. <i>Enterococcus</i> spp.	46
3.6.21. <i>Streptococcus</i> spp.	46
3.7. Diagnóstico	47
3.7.1. Contagem de células somáticas (CCS)	47
3.7.2. Culturas bacteriológicas	49
3.7.3. Teste de condutividade eléctrica	51
3.7.4. N-acetil-b-D-glucosaminidas (NAGase)	51
3.7.5. Detecção de anticorpos no leite	51
3.7.6. Técnicas moleculares	51
3.8. Tratamento	52
3.8.1. Antibioterapia	52
3.8.2. Tratamento no período seco	58
3.8.3. Tratamento em novilhas	59
3.8.4. Tratamento de suporte:	60
3.9. Resistências aos agentes antimicrobianos	62
3.10. Controlo	64
4. Estudo de caso	68
4.1. Objectivos	68
4.2. Material e métodos	69
4.3. Resultados	71
4.4. Discussão	77
5. Conclusão	82
6. Referências bibliográficas	83

Anexo I – Casuística total do Estágio Curricular	95
Anexo II – Tabelas da correlação de Spearman	100

Lista de Tabelas

Tabela 1– Casuística mais frequente em bovinos.....	3
Tabela 2 – Casuística mais frequente em suínos	4
Tabela 3 – Interpretação e leitura do TCM	48
Tabela 4 – Estimativa da percentagem de quartos infectados com base na CCS no leite do tanque	49
Tabela 5 – Número de infecções intra-mamárias com sinais clínicos em 7 vacarias durante 20 meses.....	50
Tabela 6 – Agentes antimicrobianos e via de administração mais apropriada para cada agente	57
Tabela 7 – Caracterização das três explorações	70
Tabela 8 – Prevalência dos diferentes agentes identificados	71
Tabela 9 – Frequência dos agentes isolados.....	72
Tabela 10 – Prevalências dos agentes nas diferentes explorações	72
Tabela 11 – Resultado do TCM por agente isolado	75
Tabela 12 – Resistências aos antimicrobianos	76
Tabela 13 – Prevalências e frequências de agentes patogénicos causadores de mastites em diferentes estudos.....	78

Lista de gráficos

Gráfico 1– Percentagem de animais assistidos por espécie	2
Gráfico 2 – Distribuição da casuística por aparelhos/tecidos	4
Gráfico 3 – Número de agentes contagiosos e ambientais.....	71
Gráfico 4 – Histograma de dia de lactação na presença de agentes microbianos	73
Gráfico 5 – Média \pm DP de número de lactação em 5 agentes microbianos.....	74
Gráfico 6 – Percentagem de animais com presença de agentes por número de lactação	74

Lista de figuras

Fig. 1 – Vaca com mastite gangrenosa	29
Fig. 2 – Leite de mastites por coliformes.....	36
Fig. 3 – Extremidades dos tetos descoradas.....	38

Abreviaturas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ADS – Associação de Defesa Sanitária

AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism*

AINEs – Anti-inflamatórios não esteróides

BHV-1 – Herpesvírus Bovino Tipo 1

BHV-4 – Herpesvírus Bovino Tipo 4

CCS – Contagem de Células Somáticas

Cl – Cloro

CMB – Concentração Mínima Bactericida

CMI – Concentração Mínima Inibitória

DDBSA – ácido dodecil benzeno sulfônico

DP – desvio padrão

ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EUA – Estados Unidos da América

EV – Endovenoso

FMDV – *Foot and Mouth Disease Virus*

Ig – Imunoglobulinas

IM – Intramuscular

IS – Intervalo de Segurança

K - Potássio

Kg – Kilograma

KPa – Quilopascal

LPS – lipopolissacáridos

m - metros

mg – miligrama

ml – mililitro

MLST – *Multi Locus Sequence Typing*

mm – milímetro

Na - Sódio

NARMS – *National Antimicrobial Resistance Monitoring System*

NIRD – *National Institute of Research in Dairying*

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPP – Organização de Produtores Pecuários

PCR – *Polimerase Chain Reaction* (Reacção da polimerase em cadeia)
PFGE – *Pulse Field Gel Electrophoresis* (Electroforese em campo pulsado)
PI3 – Parainfluenza 3
PMN – Polimorfonucleares
ppm – parte por milhão
RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*
SCN – *Staphylococcus* Coagulase-Negativa
SUAM – *Streptococcus uberis Adhesion Molecule*
TCM – Teste Californiano de Mastites
UI – Unidades Internacionais

1. Introdução

A mastite bovina é das doenças mais comuns e com maiores custos que afecta os bovinos leiteiros. Devido à crise que se tem verificado neste sector, torna-se essencial a sua prevenção, o que deve constituir uma prioridade para produtores e veterinários.

Para se poder actuar correctamente é fundamental não só conhecer os agentes etiológicos de mastites em Portugal como também o seu perfil de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. O conhecimento das resistências aos antibióticos irá contribuir para a redução e uso racional de antibióticos na produção leiteira, o que traz benefícios quer económicos quer em termos de saúde pública.

Nesta dissertação, irei começar por uma síntese das actividades realizadas durante o meu estágio final de curso, seguida de uma revisão bibliográfica sobre mastites, a qual servirá de fundamentação teórica para o meu estudo de caso, que consiste num estudo retrospectivo sobre agentes de mastites e a sua sensibilidade a antimicrobianos, realizado em três explorações situadas no concelho de Montemor-o-Velho.

2. Relatório de estágio

2.1. Nota introdutória

O estágio final do curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa é fundamental para que se possa aplicar de forma prática os conhecimentos adquiridos durante os 5 anos precedentes.

O meu estágio consistiu no acompanhamento do Dr. Luís Gomes, médico veterinário, na área de Clínica de espécies pecuárias, maioritariamente da espécie bovina, em particular bovinos de aptidão leiteira. Também pude acompanhar a Dr.^a Elsa Monteiro Grillo, Médica Veterinária Coordenadora e Executora da Organização de Produtores Pecuários (O.P.P.) da Cooperativa Agrícola do Conselho de Montemor-o-Velho.

O estágio realizado tinha como base a zona de Montemor-o-Velho, estendendo-se também a algumas zonas de Cantanhede e Figueira da Foz. E teve a duração de cerca de 4,5 meses (do dia 12 de Outubro de 2010 a 26 de Fevereiro de 2011). Segue-se uma descrição resumida das actividades realizadas e um relatório da casuística acompanhada.

2.2. Descrição das actividades

No ADS, de acordo com a legislação em vigor, efectuou-se a tuberculinização dos bovinos adultos para posterior verificação da reacção, e a colheita de sangue para pesquisa de Brucelose, Leucose Bovina e Peripneumonia Contagiosa Bovina. Nos pequenos ruminantes foi efectuada a vacinação contra a Febre Catarral Ovina (“Língua Azul”) e colheita de sangue para pesquisa de Brucelose. Pontualmente, a pedido dos proprietários, era realizada a desparasitação dos bovinos ou dos ovinos.

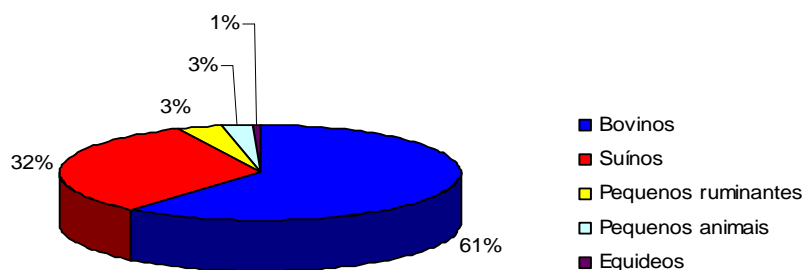
Por sua vez, o trabalho de clínica consistia na visita às explorações, mediante chamada telefónica. A maior parte da actividade incidiu sobre a espécie bovina, essencialmente vacas leiteiras, onde foram contabilizados 403 casos.

Em seguida surge alguma clínica de suínos em explorações de tipo familiar, tendo sido acompanhados 212 casos.

A clínica de pequenos ruminantes e de equídeos apresentaram menor expressão, tendo sido contabilizados 22 e 4 casos, respectivamente.

Ocasionalmente também era feita alguma clínica a animais de companhia, onde foram contabilizados 17 casos.

Gráfico 1 – Percentagem de animais assistidos por espécie



Na tabela 1 estão referidas, de uma forma sucinta, a patologia e actividades mais frequentes observadas em bovinos (a casuística completa encontra-se no anexo I).

Tabela 1 – Casuística mais frequente em bovinos

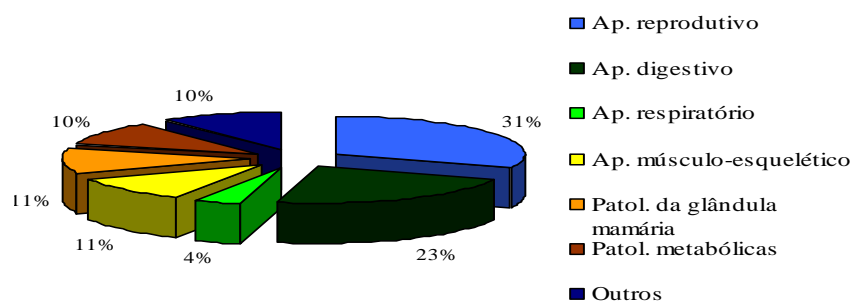
Situação	Nº casos
Deslocamento do abomaso à esquerda	29
Deslocamento do abomaso à direita	8
Estase ruminal	20
Diarreia	13
Hipocalcémia	16
Cetose	18
Fígado gordo	8
Mastites	43
Síndrome de vaca caída	42
Patologias reprodutivas	98
Partos distócicos	11
Patologia podal	10
Pneumonia	16
Eutanásias	14

Participei ainda no acompanhamento reprodutivo de 6 explorações leiteira. As visitas eram normalmente quinzenais, excepto em 1 exploração em que era feita 2 vezes por semana, e consistia no diagnóstico e confirmação de gestação, exame reprodutivo pós-parto e diagnóstico de infertilidade, tudo por palpação rectal. Estes exames permitem uma resposta em tempo real sobre a presença ou ausência de gestação, o estado de involução uterina e a presença de corrimentos uterinos indicadores de infecção, bem como a eventual necessidade de recorrer a tratamentos ou a protocolos de sincronização de estro. Ao todo realizei 68 visitas a explorações no âmbito de acompanhamento reprodutivo.

De um total de 355 consultas acompanhadas a bovinos, assisti a 30 cirurgias, 19 das quais foram cirurgias para resolução de deslocamento do abomaso à esquerda (dos 29 identificados ao longo do estágio), 8 deslocamentos do abomaso à direita, 2 cesarianas e 1 resolução de hérnia umbilical.

A componente clínica exercida na espécie bovina abrangeu uma grande variedade de órgãos, podendo ser agrupadas em aparelho reprodutor, aparelho digestivo, aparelho respiratório, aparelho músculo-esquelético, patologia da glândula mamária, patologia metabólicas e outras. No gráfico 2, está representada a frequência de cada sistema envolvido na patologia observadas em bovinos.

Gráfico 2 – Distribuição da casuística por aparelhos/tecidos



Na clínica de suínos, a patologia mais frequentes encontram-se referidas na tabela 2 (a restante casuística encontra-se em anexo).

Tabela 2 – Casuística mais frequente em suínos

Situação	Nº casos
Indigestão	10
Doença dos edemas	28
Dermatite exsudativa	34
Diarreia	36
Psoríase rósea	20
MMA	8
Mal rubro	8
Febre	6
Partos distócicos	4

MMA – Mastite-metrite-agalaxia

Os dados referentes a toda a casuística observada durante o meu estágio podem ser consultadas no anexo I.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Anatomia e fisiologia da glândula mamária

A glândula mamária bovina, também denominada por úbere, deriva na sua génese de uma glândula sudorípara altamente modificada (Sisson, 1986).

O úbere das vacas é constituído por quatro glândulas mamárias individuais, cada uma com o seu teto distinto, não existindo fluxo de leite entre quartos nem um significativo fluxo directo de sangue de um quarto para o outro (Adkinson, Ingawa, Blouin & Nickerson, 1993).

Cada quarto é composto pela cisterna do teto, cisterna da glândula, ductos galactóforos e tecido glandular (Lévesque, 2004). O leite é produzido pelas células epiteliais alveolares, que delimitam os alvéolos que, por sua vez, estão rodeados por células mioepiteliais. Quando ocorre o estímulo para a descida do leite executado pela ocitocina, estas células contraem-se, impelindo o leite dos alvéolos para os ductos, fluindo daí para a cisterna da glândula e, em seguida, para o teto (Davidson & Staberfeldt, 2007).

Uma das adaptações anatómicas importantes do úbere, que permite às vacas leiteiras transportar grandes quantidades de leite, é o desenvolvimento de um possante sistema de suspensão, constituído pelo ligamento suspensório interno (entre os pares de glândulas mamárias) e pelo ligamento suspensório lateral (Davidson & Staberfeldt, 2007). Um ligamento suspensório forte é essencial para manter um úbere de grandes dimensões limpo e saudável (Lévesque, 2004).

O úbere das vacas leiteiras de hoje tem uma enorme capacidade de produzir e armazenar leite, pelo que é fundamental uma boa irrigação para haver o fornecimento dos nutrientes necessários à produção de tanto leite. Para a produção de um litro de leite é necessária a circulação pelo úbere de 400 a 500 litros de sangue, o que na vaca leiteira corresponde a aproximadamente 280ml de fluxo de sangue por segundo (Biggs, 2009).

A síntese de leite é controlada pela prolactina, produzida pela glândula pituitária. No entanto, nas vacas, a secreção contínua de leite é influenciada por: uma interacção complexa de esteróides, segregados pelas glândulas adrenais; hormonas da tiróide, essencialmente tiroxina; e hormona do crescimento ou somatotropina, segregada pela glândula pituitária (Davidson & Staberfeldt, 2007).

Como referido anteriormente, a ocitocina é a hormona mais importante no reflexo da descida do leite, uma vez que menos de 20% do leite se encontra nas cisternas do teto e da glândula mamária, pronto a ser ordenhado, estando o restante leite nos ductos galactóforos e nos alvéolos (Bruckmaier & Bloom, 1998). O reflexo da descida do leite ocorre por estimulação

táctil do úbere que pode ocorrer quando a vaca sente o vitelo a mamar ou quando as mãos do ordenhador estimulam os receptores neuronais presentes na pele dos tetos, os quais emitem um sinal por via nervosa para o hipotálamo, onde são produzidas as hormonas precursoras da ocitocina. Também os estímulos auditivos, visuais e olfactivos, que ocorrem perto ou dentro da sala de ordenha, podem induzir a libertação de ocitocina (Davidson & Staberfeldt, 2007). Segundo Blowey (1999) este processo pode ser inibido pela acção da adrenalina, pelo que se torna fundamental reduzir o stress na sala de ordenha para se obter um adequado fluxo de leite. É importante ainda salientar que o reflexo de descida do leite, mediado pela ocitocina, provoca também o engurgitamento de vasos linfáticos interligados, o que permite que, durante a ordenha, o teto se mantenha rígido, facilitando a saída de leite e evitando o colapso da cisterna do teto (Hamann, 2000 citado por Sousa, 2008).

3.2. Mecanismos de defesa da glândula mamária

A glândula mamária possui inúmeras defesas naturais que a ajudam no grande desafio imunológico a que está sujeito.

Os mecanismos de defesa consistem numa mistura de barreiras internas e externas. As barreiras externas incluem tanto a pele como o canal do teto, enquanto as barreiras internas podem ser divididas em factores humorais não específicos (lactoferrina, lactoperoxidase, lisozimas, citoquinas e complemento), factores humorais específicos (imunoglobulinas) e defesa celular (leucócitos e neutrófilos) (Biggs, 2009).

O canal do teto consiste na primeira barreira do úbere e na principal defesa anatómica (Sousa, 2008). Assim que as bactérias ultrapassam o canal do teto entram em contacto com células do sistema imunitário, que têm um papel importante na resposta inflamatória que é gerada (Sordillo, Shafer & Derosa, 1997).

3.2.1. Pele dos tetos

A pele dos tetos é constituída por epitélio escamoso estratificado e a contínua descamação da superfície das células leva à formação de queratina que tem propriedades antibacterianas e bloqueia fisicamente a entrada de microrganismos (Biggs, 2009). Os ácidos gordos presentes na queratina dos tetos têm também uma acção bacteriostática (Archbald, 1999).

3.2.2. Canal do teto

O esfíncter do canal do teto é formado por pregas de epitélio escamoso estratificado que se unem no canal do teto, selando assim a entrada. Também a existência de músculo liso e tecido

elástico a rodear as pregas controla a abertura e fecho do canal. Forma-se ainda um tampão de queratina que evita a entrada de microrganismos após a ordenha e que possui inibidores da multiplicação bacteriana. Este tampão de queratina funciona como um selante do canal do teto durante o período seco e entre ordenhas (Paulrud, 2005).

As proteínas do canal do teto têm também demonstrado, a pH fisiológico, carga electrostática suficiente para se ligarem aos agentes de mastites destruindo-os (Archbald, 1999). No entanto, há que ter em conta que o canal do teto se mantém aberto durante 20 a 30 minutos depois da ordenha e que a pressão exercida pelos músculos à volta do canal do teto varia com o número de lactação, fase da lactação e tempo depois da ordenha (Biggs, 2009). Nas vacas secas a formação do rolhão de queratina torna-se essencial para proteger o canal do teto contra a entrada de agentes patogénicos e assim evitar infecções intra-mamárias (Dingwell *et al.*, 2004).

3.2.3. Lactoferrina

A lactoferrina é uma glicoproteína produzida pelas células fagocitárias e pelas células produtoras do leite, com importantes propriedades antimicrobianas. Influencia a proliferação dos linfócitos, aumenta a produção dos radicais hidroxilo pelos neutrófilos e regula a actividade citotóxica dos leucócitos (Wang & Hurley, 1998). Uma das suas funções mais importantes é a capacidade para sequestrar iões de ferro, não o deixando livre para ser integrado no metabolismo de algumas bactérias aeróbias, o que regula o crescimento bacteriano. Para *Staphylococcus* e para coliformes, o ferro é um componente fundamental das enzimas da cadeia respiratória bacteriana, pelo que os torna particularmente susceptíveis à presença de lactoferrina (Sandholm, Honkanen-Buzalski, Kaartinen & Pyorala, 1995 citado por Sousa, 2008).

A lactoferrina tem ainda um efeito anti-inflamatório, pois pode minimizar os efeitos oxidativos resultantes de um processo inflamatório (Biggs, 2009).

3.2.4. Lactoperoxidase

A lactoperoxidase é uma enzima com poder oxidante de determinadas estruturas da parede celular das bactérias, sendo bactericida para bactérias Gram negativas e bacteriostática para a generalidade das bactérias Gram positivas (Sordillo *et al.*, 1997). No entanto, este sistema parece ser inactivado pelo leite e, portanto, tem maior relevância no período seco (Biggs, 2009).

3.2.5. Lisozimas

As lisozimas são enzimas que inibem o crescimento ou destrói as bactérias Gram positivas e Gram negativas, e pode provir do sangue ou ser sintetizada na própria glândula mamária. Durante a inflamação, pensa-se que os leucócitos sejam a maior fonte de lisozimas (Biggs, 2009).

3.2.6. Complemento

O complemento é constituído por um conjunto de proteínas presentes no leite e no plasma, que reconhecem e destroem microrganismos, iniciam e potenciam a resposta dos anticorpos e desagregam complexos de precipitados antígeno-anticorpo (Korhonen, Marnila & Gill, 2000). A origem das proteínas pertencentes ao complemento que se encontram no leite tem sido bastante especulada. Segundo Rainard (2003), no leite normal as proteínas do complemento passam para o leite por transudação, enquanto nos casos de infecção a passagem é feita por exsudação. Sabe-se que o complemento tem um efeito importante na fagocitose de *Streptococcus* spp. e é bactericida para *E. coli* (Biggs, 2009).

3.2.7. Citoquinas

As citoquinas são produzidas por células do sistema imunitário e fazem a sinalização de proteínas. Favorecem a migração de neutrófilos para a área da inflamação e aceleram a involução precoce da glândula mamária, reduzindo assim o tempo de particular susceptibilidade a infecções (Biggs, 2009), sendo essenciais no desenvolvimento de um processo infeccioso. No entanto, o tipo de citoquinas é variável de acordo com a fase de lactação (Alluwaimi, 2007).

3.2.8. Imunoglobulinas

As imunoglobulinas são os mais importantes factores de imunidade humoral específica da glândula mamária. São quatro os isotipos de anticorpos que normalmente estão envolvidos na defesa da glândula mamária: IgG₁, IgG₂, IgA e IgM. Estas imunoglobulinas têm diferentes funções e a sua concentração no leite varia com o estado de saúde do úbere e a fase da lactação (Biggs, 2009).

A IgG₁ tem a capacidade de estimular macrófagos e neutrófilos, mas é a IgG₂ que tem maior capacidade opsonizante, facilitando a acção dos neutrófilos (Burton & Erskine, 2003). A IgG₁ e a IgM também são opsonizantes e a IgA, apesar de não ter actividade opsonizante, neutraliza toxinas e impede a adesão e colonização da glândula mamária pelos microrganismos (Sordillo *et al.*, 1997).

3.2.9. Leucócitos

As principais células presentes no leite são os macrófagos, os neutrófilos, os linfócitos e algumas células epiteliais. O leite produzido por um úbere saudável tem contagens de células somáticas inferiores a 100.000 células/ml. Quando uma mastite se instala, estes números sobem rapidamente para contagens de vários milhões, sobretudo devido à migração dos leucócitos para o local da infecção (Sousa, 2008), uma vez que do total de células somáticas, 75 a 98% correspondem a células de defesa e apenas 2 a 25% a células epiteliais (Voltolini *et al.*, 2001).

Num úbere saudável, os macrófagos são predominantes e actuam como sentinelas de invasões de agentes patogénicos (Biggs, 2009). Estas células produzem a interleuquina 1 que activa a síntese de prostaglandinas e leucotrienos que são potentes quimiotácticos de neutrófilos (Sousa, 2008).

3.2.10. Neutrófilos

Os neutrófilos são os leucócitos mais numerosos numa situação de mastite, constituindo até 95% das células somáticas (Biggs, 2009). O complemento, os anticorpos, os factores quimiotácticos, as enzimas e algumas hormonas regulam o funcionamento dos neutrófilos, que têm como principal função a fagocitose e destruição de bactérias (Sousa, 2008). No entanto, os neutrófilos presentes no leite de um úbere saudável têm as suas capacidades fagocíticas e bactericidas diminuídas em relação aos neutrófilos sanguíneos (Biggs, 2009).

3.3. A mastite bovina

Mastite é a inflamação do parênquima da glândula mamária resultante, geralmente, da sua infecção por microrganismos patogénicos. Caracteriza-se por uma alteração da composição física e química do leite e alterações patológicas no tecido glandular. As alterações mais importantes do leite incluem descoloração, presença de coágulos de fibrina e um número elevado de leucócitos. No entanto, também há alteração na composição do leite, diminuindo a α e β caseína, a α -lactoalbumina, a β -lactoglobulina, a lactose e o potássio, e aumentando a albumina sérica, as imunoglobulinas, o sódio e o cloro (Müller, 2002). Apesar de em muitos casos ocorrer edema, aumento da temperatura, dor e consistência do quarto, a maioria das mastites não são reconhecidas através da palpação manual, nem pelo exame visual do leite. Nestes casos, o seu diagnóstico é feito através de testes indirectos que dão informação sobre a quantidade de células existentes no leite (Radostits, Gay, Blood & Hinchcliff, 2000).

Nos bovinos leiteiros, as mastites são quase sempre causadas por microrganismos, geralmente bactérias, que invadem o úbere, multiplicando-se na glândula mamária e sintetizando toxinas que são a causa imediata das lesões.

As mastites podem ser classificadas de acordo com o grau de inflamação:

- Mastite subclínica – existe uma pequena inflamação da glândula mamária não observável visualmente, mantendo-se o leite e o quarto afectado com uma aparência normal. No entanto, é possível demonstrar a presença de microrganismos no leite através da cultura microbiológica. Por outro lado, as alterações inflamatórias na glândula mamária podem ser detectadas pelo aumento das células somáticas que se verifica devido ao influxo de leucócitos. As mastites subclínicas podem evoluir rapidamente (algumas horas) ou lentamente (alguns meses) para mastites clínicas, ou podem resolver-se espontaneamente (Lévesque, 2004). Dependendo do tipo de agente, as mastites subclínicas são cerca de 15 a 40 vezes mais frequentes do que as mastites clínicas (Biggs, 2009).
- Mastites clínicas – existem diferentes graus de mastites clínicas. Nas mastites sub-agudas o leite apresenta-se com alterações macroscópicas, observando-se a presença de “farrapos”, continuando o úbere com uma aparência normal. Os “farrapos” não passam de aglomerados de detritos celulares, leucócitos, fibrina e outras proteínas. Nos casos moderados o úbere apresenta-se visivelmente inflamado (vermelho, duro, aumentado, quente e doloroso). Nas mastites agudas, o leite pode aparecer sanguinolento, aquoso ou seroso e a sua produção diminui bruscamente. Podem estar presentes sinais sistémicos que incluem febre, anorexia, estase ruminal, aumento da pulsação, desidratação e depressão do estado geral do animal. Como a infecção pode provocar uma diminuição dos níveis de cálcio no sangue, a vaca pode apresentar sintomas de hipocalcémia (Lévesque, 2004).

3.4. Impacto económico das mastites

A mastite é reconhecida mundialmente como a doença mais comum e com maiores custos económicos que afecta os bovinos leiteiros (Gerlach, Alvarez, Denogean, Medina & Gerlach, 2009). No entanto, a maioria dos produtores não se apercebe das grandes perdas dado que esta patologia raramente causa mortalidade (Ravaomanana, Rasambainarivo, Perrot, Razafiarison & Rakotonindrina, 2004).

Estima-se que os custos de mastites na indústria láctea no Reino Unido sejam de aproximadamente 200 milhões de libras por ano, e que o custo mundial seja de 200 mil milhões de dólares por ano (Biggs, 2009).

Os prejuízos devido às mastites clínicas podem ser divididos em directos ou indirectos. As perdas directas incluem o valor das vacas, o tratamento (custo dos medicamentos, serviços veterinários e aumento da mão-de-obra) e a redução do leite vendido devido à rejeição do leite. Esta rejeição deve-se essencialmente: a elevadas contagens de células somáticas (CCS); a alterações macroscópicas do leite; e à presença de resíduos de antibióticos, durante o tratamento e durante o intervalo de segurança (IS) dos fármacos usados. As perdas indirectas incluem a redução de produção, recidivas durante a lactação, aumento da predisposição a outras doenças, aumento do risco de refugo, altas taxas de substituição e perda do potencial genético (Biggs, 2009). Estima-se que o custo da mastite clínica seja de 100 dólares por caso (Lévesque, 2004).

Nas mastites subclínicas os prejuízos indirectos referem-se a efeitos no efectivo leiteiro (fonte de infecção para outras vacas, aumento da incidência de mastites clínicas e redução da produção), penalização financeira por alteração da qualidade do leite, CCS elevada, presença de microrganismos no leite e causa de aparecimento de resíduos de antibióticos no leite (Biggs, 2009).

As mastites clínicas e subclínicas também podem ter efeitos na performance reprodutiva das vacas, aumentando os dias até ao primeiro serviço e o número de serviços por concepção. A ocorrência de mastites clínicas durante os primeiros 45 dias de gestação aumenta ainda a probabilidade de morte embrionária (Lévesque, 2004).

3.5. Factores predisponentes

As mastites são doenças multifactoriais, pelo que resultam da interacção entre factores de risco individuais, ambientais e de manejo da ordenha.

Os principais factores de risco individuais são:

- Idade e número de lactação

A prevalência de quartos infectados aumenta com a idade, atingindo o pico aos 7 anos (Radostits *et al.*, 2000). Os resultados de um estudo efectuado por Reyes e Mellado (1994) demonstraram que as vacas com mais de dois partos apresentavam maior risco de ter mastites, provavelmente, porque o período seco corresponde à fase mais propícia para que ocorra infecções do úbere, e as vacas primíparas não passam por esta fase. Por outro lado, as vacas

mais velhas tendem a ter infecções mais longas e que causam efeitos mais extensos no tecido glandular (Reneau, 1986). No entanto, segundo Leitner, Krifucks, Jacoby, Lavi e Silanikove (2008), nas vacas pluríparas, com altos níveis de imunoglobulinas no colostro, existe uma menor incidência de mastites.

- Quarto

A taxa de mastites também varia consoante o quarto do úbere. Num estudo efectuado por Adkinson *et al.* (1993), observou-se que os quartos posteriores tinham mais casos de mastites do que os quartos anteriores. Isto deve-se provavelmente ao facto de estes tetos estarem mais predispostos a traumatismos e lesões do que os tetos anteriores. Outro factor que parece ser determinante nos quartos afectados é a distância entre os tetos, sendo por isso menos provável que sejam afectados ao mesmo tempo os quartos na diagonal, seguindo-se dos quartos anteriores, quartos anteriores e posteriores e por fim entre os quartos posteriores.

- Fase da lactação

A maioria das infecções novas ocorre durante o início do período seco e nos primeiros dois meses de lactação, especialmente quando são causadas por agentes ambientais. Nas novilhas, a prevalência de infecção é mais elevada no último trimestre da gestação e alguns dias antes do parto, sofrendo depois uma acentuada descida após o parto (Radostits *et al.*, 2000). Segundo Reneau (1986), no fim da lactação a detecção de infecções causadas por agentes considerados menores é mais fácil devido à diminuição da produção de leite. Contudo, as vacas recém-paridas têm maior dificuldade em montar uma resposta eficiente contra uma invasão por *E. coli* (Blowey, 1999), provavelmente devido às alterações hormonais associadas à gestação, ao balanço energético negativo verificado no início da lactação e às alterações que o tecido mamário sofre durante o período seco (Grabowski, Hamann & Klein, 2008).

- Produção de leite

As vacas de alta produção têm maior predisposição a desenvolver mastites por vários motivos. Por um lado, com o aumento da produção de leite aumenta a taxa de fluxo de leite durante a ordenha, o que leva a que exista maior remoção da queratina existente no canal do teto. Nestes casos, a regeneração total do “rolhão” de queratina demora mais tempo (Capudo, Wood, Bright, Miller & Bitman, 1990), pelo que a vaca fica mais predisposta à invasão de microrganismos entre ordenhas. Por outro lado, a taxa de fluxo de leite está normalmente relacionada com o comprimento e o diâmetro do canal do teto e quanto maior o diâmetro do canal do teto, maior é a susceptibilidade das vacas a desenvolver mastites (Paulrud, 2005).

É importante ainda referir que as vacas de alta produção têm mais predisposição a apresentarem um balanço energético negativo, o que favorece o aparecimento de doenças, como é o caso das mastites (O'Rourke, 2009).

- Contagem de células somáticas (CCS)

Sabe-se que existe uma maior taxa de mastites clínicas causadas por microrganismos Gram negativos, como *E. coli*, *Klebsiella* spp. ou *Pseudomonas* spp. nos efectivos que normalmente têm baixas CCS (Barkema *et al.*, 1998) e baixa prevalência de infecções subclínicas (Radostits *et al.*, 2000).

- Raça

Tem-se verificado uma maior incidência de mastites em vacas de raça Holstein Friesian do que em vacas Jersey, mas não se sabe até que ponto é que isso não será influência do diferente manejo. Até à data, ainda não foram efectuados estudos válidos de comparação entre raças (Radostits *et al.*, 2000). No entanto, um estudo realizado por Nyman (2007) mostrou que existem alguns indícios de que a raça Vermelha Sueca apresenta maior saúde do úbere do que a Sueca Holstein. Uma das razões que pode explicar este facto tem a ver com a implementação de programas de melhoramento genético que têm em conta parâmetros como a resistência a mastites.

- Selecção genética

A selecção das vacas leiteiras tem sido feita com base nas características fenotípicas que têm por objectivo a maior produtividade dos animais. Essas características incluem a conformação corporal, aprumos, conformação e tamanho do úbere e forma e posição dos tetos (Biggs, 2009).

Historicamente, a selecção das vacas para a resistência a mastites tem-se centrado em dois aspectos: características do úbere e dos tetos, que se relacionam com as defesas primárias da glândula mamária contra os agentes patogénicos, e CCS (Pighetti, 2006).

A susceptibilidade genética a mastites também está directamente relacionada com a capacidade de produzir leite. Apesar da produção de leite ter uma grande componente de hereditabilidade, a produção continua a ser mais influenciada pela nutrição ou pelo manejo ambiental. Segundo alguns estudos, apenas 10% da resistência a mastites pode ser atribuída à genética (Biggs, 2009).

A hereditabilidade da conformação do úbere e do formato dos tetos é moderada a elevada, pelo que a selecção de vacas com características desejáveis pode ajudar na redução da

incidência de mastites. Vários estudos sugerem que úberes com tetos com forma afunilada têm menor incidência de infecção do que aqueles com formas cilíndricas. Também vacas com úberes grandes e pendulares são mais susceptíveis a desenvolver mastites (Lévesque, 2004). O formato da extremidade do teto também tem alguma importância na resistência a mastites e, pelo que se sabe, tem elevada hereditabilidade. Tetos pontiagudos são mais predispostos a lesões no orifício do teto e tetos curtos e finos têm maior risco de provocarem queda das tetinas (Lévesque, 2004).

- Estado nutricional

É frequente afirmar-se que “a nutrição está subjacente a todas as doenças”, uma vez que qualquer deficiência nutricional resulta numa redução da capacidade de resposta do sistema imunitário (Biggs, 2009).

Sabe-se que suplementando a dieta das vacas de leite com alguns antioxidantes como o selénio, a vitamina A e a vitamina E, diminui não só a incidência mas também a duração de mastites clínicas (Radostis *et al.*, 2000). Também a suplementação da dieta com vitamina C durante o período peri-parto diminui os casos de mastites, uma vez que esta vitamina melhora a função dos neutrófilos (Mehrzaad, Garoussi, Rad, Farzaneh & Hashemitabar, 2008). Uma alimentação rica em beta-carotenos, nesta fase, melhora o sistema imunitário do animal (Lévesque, 2004), assim como a existência de micronutrientes como o cobre e o zinco na dieta do animal são essenciais à manutenção das boas defesas da glândula mamária (Sordillo *et al.*, 1997). Segundo um estudo efectuado por Scaletti, Trammell, Smith e Harmon (2003) novilhas com uma dieta rica em cobre têm maior resistência a mastites por *E. coli* na primeira lactação. A suplementação com zinco, por sua vez, é essencial para a formação do tampão de queratina no canal do teto (O'Rourke, 2009).

Riekerink, Barkem, Poole, Kelton e Scholl (2007a) conduziram um estudo no Canadá onde se demonstrou que o uso de silagem de milho e beterraba na alimentação das vacas de leite diminuía a incidência de mastite clínica. Isto verificou-se, provavelmente, porque uma alimentação rica nestes alimentos fornece uma adequada quantidade de energia, minerais (como o selénio e o zinco) e vitaminas (como a vitamina A e a vitamina C) essenciais para a manutenção de um bom sistema imunitário e, consequentemente, de um úbere saudável.

A nutrição também pode afectar indirectamente as mastites através do efeito que causa na consistência das fezes. Uma dieta bem formulada permite que a consistência das fezes seja a adequada para que não haja uma significativa contaminação fecal dos tetos, o que reduz o risco de desenvolvimento de mastites ambientais (Biggs, 2009).

É importante referir que a qualidade e higiene dos alimentos é um factor com bastante importância. Os alimentos, quando mal armazenados podem ser contaminados com microrganismos que alteram o seu valor nutricional (Nyman *et al.*, 2007) podendo aumentar a susceptibilidade das vacas em contrair doenças, como é o caso das mastites.

- Ocorrência de outras doenças

Sabe-se que a retenção placentária e lesões e feridas nos tetos podem estar associados a um aumento da incidência de mastites. Também a existência de úlceras da sola (de qualquer gravidade) em mais do que um dígito, aumentam cerca de 3 vezes a probabilidade de mastite por *Staphylococcus aureus* na primeira lactação (Radostits *et al.*, 2000). A cetose é outra das doenças que aumenta a probabilidade de aparecimento de mastites, possivelmente devido à diminuição da capacidade de fagocitose pelos polimorfonucleares (PMN) e pelos macrófagos, assim como à diminuição da migração de leucócitos do sangue para a glândula mamária (O'Rourke, 2009).

- Tipo de vacarias

Não existem muitos estudos sobre a relação entre o tipo de vacarias e a incidência de mastites. No entanto, num estudo realizado por Nyman *et al.* (2007) verificou-se que as vacarias com maior produção tinham maior incidência de mastites clínicas reportadas. Esta diferença entre o tipo de vacarias pareceu estar relacionado não só com o diferente manejo verificado nas diferentes explorações, como pelo objectivo de cada uma delas. Enquanto as explorações com altas produções seleccionavam as vacas de acordo com a sua produção, nas vacarias com produções mais baixas a selecção era feita tendo em conta a resistência a mastites. Por outro lado, as vacarias com menor produção tendiam a demorar mais tempo a chamar o veterinário para tratar uma mastite, enquanto que as de grande produção chamavam logo que era identificado o mínimo sinal. Também a qualidade higiénica da alimentação era mais importante nas explorações de baixa produção.

- Prevalência da infecção na vacaria

Quanto maior a prevalência de mastites por agentes considerados maiores na vacaria, maior a taxa de novas infecções e a duração das mesmas (Radostits *et al.*, 2000).

No entanto, pensa-se ainda que a infecção natural do úbere com os considerados agentes menores (como por exemplo, o *Corynebacterium bovis*), serve de factor de protecção para as infecções de agentes maiores. Assim, canais de tetos colonizados com estes microrganismos têm menor probabilidade de desenvolver novas infecções (Radostits *et al.*, 2000).

Factores ambientais:

- Estação do ano

A relação entre a incidência de mastites e a estação do ano é muito variável, dependendo das condições climáticas e geográficas da região. Em climas tropicais e subtropicais, a incidência é maior durante o Inverno e a Primavera, devido ao aumento da humidade. Nos climas temperados, a incidência de mastites é maior no Outono e no Inverno, quando as vacas passam longos períodos estabuladas (Radostits *et al.*, 2000).

No entanto, no Estado de Minnesota, onde o clima é temperado, há um aumento da CCS no Verão e uma diminuição durante o Inverno. Isto deve-se a um aumento da contaminação dos tetos na altura do ano em que se encontram as melhores condições para o crescimento bacteriano, não só devido às condições ambientais propícias (temperaturas mais elevadas), mas também ao desleixo, por parte dos produtores, das boas práticas de gestão (Reneau, 1986). Num estudo efectuado por Elmoslemany e Keefe (2008) e noutro efectuado por Riekerink, Barkema e Stryhn (2007b) também se verificou haver uma grande relação entre a contagem total de bactérias existentes num tanque de leite e a estação do ano, aumentando o número de bactérias no Verão, ao contrário do que acontece no Inverno. Por isso é que é recomendável a refrigeração dos tanques.

A prevalência de *E. coli*, por exemplo, apresenta uma grande variação ao longo do ano, verificando-se valores mais elevados no Verão, enquanto que a *Klebsiella* spp. é mais comum durante a Primavera e o Outono (Locatelli *et al.*, 2008).

- Temperatura e humidade

Altas temperaturas e valores de humidade elevados provocam o aumento da CCS, ao contrário do que acontece quando o clima é seco e frio (Gilson, Smith & Ely, 2004), uma vez que estas condições favorecem o crescimento bacteriano.

Nas vacas que se encontram no pasto verifica-se normalmente uma redução da incidência de mastites por coliformes durante o Verão, enquanto a incidência de mastites por *Streptococcus* ambientais se mantém elevada. Nas vacarias onde as vacas estão estabuladas, a incidência de mastites por coliformes está mais associada a períodos de elevada precipitação (Radostits *et al.*, 2000). Isto ocorre essencialmente porque no Verão as condições no pasto não são as adequadas para o desenvolvimento de coliformes, enquanto que nas alturas de grande precipitação existe maior humidade dentro das vacarias, o que favorece o seu desenvolvimento.

- Existência de insectos

Pode ser encontrado um grande número de insectos nos tetos das vacas. Alguns insectos podem servir como vectores de agentes patogénicos como *Staphylococcus aureus* e *Arcanobacterium pyogenes*, transmitindo a infecção de um animal para outro. Os mosquitos podem ainda causar feridas nos tetos e servir como reservatórios de *Staphylococcus aureus*. É, por isso, essencial haver um bom controlo das condições ambientais e de higiene num estábulo, de modo a controlar o desenvolvimento de insectos (Lévesque, 2004).

Existem ainda as chamadas “mastites de Verão” que parecem ter como vector principal a mosca *Hydrotaea irritans*, transmissora de agentes como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Peptococcus indolicus*, *Bacteroides melaninogenicus* e *Fusobacterium necrophorum* (Biggs, 2009).

- Camas

A composição das camas é dos aspectos mais importantes no desenvolvimento de microrganismos. Os materiais das camas podem ser divididos em orgânicos e inorgânicos. Os materiais orgânicos, como por exemplo, a palha, a serradura, aparas de madeira e o papel são frequentemente reduzidos a pequenos pedaços, de forma a aumentar a área de absorção. Estes materiais biodegradáveis, apesar de serem bastante confortáveis para os animais, contêm nutrientes que permitem o crescimento dos microrganismos. Pelo contrário, materiais inorgânicos, como a areia, favorecem menos o crescimento de agentes patogénicos e retêm menos humidade (Endres, 2008).

A escolha das camas deve ser feita de acordo com um compromisso entre o conforto, o custo e a higiene (Blowey, 1999). Camas desadequadas e desconfortáveis apresentam uma grande probabilidade de serem recusadas pelas vacas, o que lhes irá provocar stress e incentivá-las a deitarem-se em áreas sujas.

A serradura e a palha são os materiais orgânicos mais frequentemente utilizados. No entanto, há que ter em conta que a serradura pode ser uma perigosa fonte de coliformes, particularmente *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, essencialmente se ficar húmida durante o tempo de armazenamento. Quanto à palha, parece ser uma boa alternativa, no entanto, permite o desenvolvimento de populações de *Streptococcus* e *Enterococcus*, em particular, de *Streptococcus uberis* (Smith & Hogan, 2006). A areia, por sua vez, mantém níveis muito baixos de coliformes, mas é menos confortável, tendo algum efeito abrasivo nos tetos. A areia também levanta alguns problemas no tratamento do estrume (Blowey, 1999).

Num estudo efectuado por Zdanowicz, Shelford, Tucker, Weary, & Keyserling (2004), vacas em camas de serradura apresentaram contagens de *Klebsiella* spp. nos tetos seis vezes superior a vacas em cama de areia.

Apesar de tudo, é importante ter em atenção que o nível de *E. coli* na cama não está necessariamente relacionado com o grau de sujidade observado visualmente, pois o material já pode estar contaminado antes de ser utilizado (Blowey, 1999).

- Conceção dos estábulos

As instalações devem ser amplas e adequadas ao número de animais. É fundamental que as vacarias apresentem condições adequadas para permitir o conforto dos animais. Para tal é necessário haver uma concepção adequada, que permita o conforto das vacas.

Os cubículos devem ter as dimensões adequadas para o tamanho das vacas, de forma a que sejam confortáveis e que permitam que os animais defequem no corredor de passagem e não nas camas. Idealmente os cubículos devem ser suficientemente compridos e largos para acomodar uma vaca Holstein (1,15m de largura e 2,4m de comprimento), e devem permitir que a vaca avance 1-1,5m para a frente, de modo a efectuar os movimentos de cabeça e de pescoço necessários para se levantar (Blowey, 1999). Quando os cubículos são pequenos e as vacas apresentam dificuldade em se levantar, ou se estiverem muito próximas das vizinhas, pode aumentar a probabilidade de ocorrer lesões no teto. Pode ser usado terra, calcário ou areia nos cubículos, mas há que ter em conta que o facto de ser mais difícil de limpar faz com que se vá acumulando urina na zona traseira da cama, o que se torna um factor de risco para desenvolvimento de mastites (Blowey, 1999). Em alguns países é frequente o uso de colchões nos cubículos; no entanto, nunca foi demonstrado que o seu uso diminuía o problema das mastites numa vacaria (Smith & Hogan, 2006).

Uma das características mais importantes do ambiente em que os animais vivem é a ventilação. As vacas perdem cerca de 55 litros de água por dia através da urina, fezes, transpiração e respiração, pelo que se as instalações não tiverem uma adequada ventilação, podem-se criar as condições de humidade ambiental ideais para um grande desenvolvimento bacteriano (Blowey, 1999).

- Densidade animal

A relação entre o número de animais e o número de cubículos existentes é um factor com grande relevância no conforto e bem-estar das vacas leiteiras.

Num estudo efectuado por Fregonesi, Tucker e Weary (2007) foi demonstrado que, perante lotações de 100% e de 150%, as vacas eram obrigadas a deitarem-se mais cedo após a

ordenha para conseguirem um cubículo. Perante esta competição, o tempo de repouso sofria uma diminuição de 12,9 horas por dia para 11,2 horas por dia quando a lotação passava de 100% para 150%, respectivamente.

- Higiene

A higiene do úbere e dos tetos é provavelmente o factor que mais influencia a infecção por microrganismos ambientais. Vários estudos comprovam a relação entre a higiene do úbere e a taxa de mastites ou CCS (Biggs, 2009).

A higiene do ambiente está muito relacionada com o manejo da exploração, sendo este parâmetro bastante influenciado pela densidade animal, pelo tipo de camas e pela frequência da limpeza das camas e dos corredores. Existem escalas de higiene (de 1 a 4), onde se contabiliza o grau de sujidade do úbere, das patas e da garupa e flanco. Quando o nível de contaminação é grande na garupa e no flanco, significa que a área de descanso da vaca se encontra muito suja, o que é uma indicação de camas pobres e má gestão na sua limpeza (Lévesque, 2004). Segundo Schreiner e Ruegg (2003) a higiene do úbere e das pernas está associada à incidência de mastites subclínicas.

- Maternidades

Como já foi referido anteriormente, as vacas de alta produção podem ser mais susceptíveis ao desenvolvimento de mastites na altura do parto, uma vez que a capacidade de resposta do sistema imunitário pode estar diminuída. Assim, é de especial importância assegurar que as vacas, no peri-parto, sejam alojadas em locais o mais limpos possível. O ideal é que cada vaca tenha a sua própria box, onde a cama seja mantida meticulosamente limpa e seca (Blowey, 1999).

Outro grande grupo de factores de risco para a ocorrência de mastites prende-se com o manejo e higiene da ordenha:

- Uso de luvas pelo ordenhador

O uso de luvas pelo ordenhador pode reduzir significativamente a probabilidade de aparecimento de mastites. A superfície das mãos é muito difícil de desinfectar e a pele humana (principalmente a das mãos) pode transmitir bactérias causadoras de mastites, sendo as mais frequentes *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e SCN, que facilmente se alojam nas gretas e fissuras existentes nas mãos do ordenhador (Blowey, 1999). É aconselhável, por isso, o uso de luvas limpas, as quais devem ser lavadas frequentemente com uma solução desinfectante, durante a ordenha (Biggs, 2009).

- Lavagem/limpeza dos tetos

Uma limpeza dos tetos é fundamental para a produção de leite de qualidade. Deve ser usada água corrente quente contendo 250 ppm de hipoclorito ou 60 ppm de iodo como desinfectante. É importante não esquecer que o depósito de onde vem a água quente deve estar tapado de modo a evitar a contaminação com poeiras e detritos, que frequentemente são a causa de mastites por *Pseudomonas*. A lavagem deve ser feita apenas aos tetos e não ao úbere inteiro, uma vez que a água proveniente do úbere, ao escorrer para os tetos, pode contaminá-los, sendo essencial que os tetos estejam limpos e secos antes da acoplagem das tetinas (Blowey, 1999). Apenas é aconselhável limpar o úbere quando este se encontra bastante contaminado com fezes líquidas, sujidade essa que mais facilmente pode escorrer para os tetos (Biggs, 2009).

A limpeza dos tetos deve ser feita com um toalhete de papel ou um pano, por vaca. Nunca se deve usar um pano ou toalhete comum, pois este servirá apenas como meio de disseminação de mastites entre vacas. Apenas se devem usar panos que sejam individuais, lavados, desinfectados e secos entre ordenhas (Blowey, 1999). A contaminação a que os panos estão sujeitos só é eficazmente removida por máquinas de lavar com água quente ou com desinfecções durante várias horas, pelo que esta opção nem sempre se torna económica.

Há ainda quem aconselhe que se rape o pêlo da cauda e do úbere, o que permite que a sujidade não adira tão bem e, por isso, reduz-se depois o tempo de preparação para a ordenha. Os pêlos podem ser removidos, por exemplo, com uma tosquiadora eléctrica (Biggs, 2009).

- Desinfecção dos tetos pré-ordenha (pré-dipping)

O objectivo do pré-dipping é diminuir o número de bactérias existentes no teto antes da colocação das tetinas, o que permite reduzir a ocorrência de mastites ambientais. Uma solução de baixa concentração de iodo (0,1%) com elevada quantidade de iodo livre (3-4 ppm) permite a morte rápida de alguns microrganismos (Biggs, 2009). Num estudo efectuado por Bade, Reinemann e Thompson (2008), demonstrou-se haver uma redução drástica no número de bactérias viáveis existentes na pele do teto depois do uso de pré-dipping.

O uso de diluições do pós-dipping pode não ter o efeito desejado, pelo que devem ser evitados. O teto deve ser mergulhado nesta solução, no mínimo durante 30 segundos (Blowey, 1999) e, depois, cada teto deve ser cuidadosamente seco com um pano ou um papel, de modo a remover o excesso de desinfectante, de bactérias e de material orgânico (Biggs, 2009).

- Remoção dos primeiros jactos de leite

A remoção dos primeiros jactos de leite é feita à mão, antes da acoplagem das tetinas. A realização deste procedimento tem vários benefícios: ajuda na detecção de mastites, contribui para o reflexo de descida do leite e retira o leite acumulado no canal do teto, removendo assim a maioria das bactérias que entraram no teto ou na glândula mamária durante a ordenha anterior, o que ajuda a diminuir os microrganismos presentes no leite. Existe uma grande discussão sobre a altura ideal para executar esta tarefa, mas nenhum estudo provou haver vantagens claras em retirar os primeiros jactos antes ou depois da limpeza dos animais (Fuhrmann, 2002). Para prevenir a contaminação da sala de ordenha, os primeiros jactos de leite devem ser removidos para o interior de um recipiente com fundo escuro, de modo a facilitar a detecção de alterações no leite (Sousa, 2008).

- Colocação das tetinas

A colocação das tetinas deve ser efectuada o mais rapidamente possível após a preparação dos tetos, de modo a coincidir com a libertação de ocitocina, não devendo por isso passar de 1 a 1,5 minutos. É essencial que, durante este processo, haja o mínimo de entrada de ar para o sistema, de forma a que os níveis de vácuo se mantenham estáveis, reduzindo o risco de desacoplagem das tetinas e forças de impacto (Biggs, 2009). Para que todos os quartos sejam ordenhados de igual forma, as tetinas devem ficar correctamente alinhadas, caso contrário o desconforto provocado pela ordenha pode levar a que os animais retirem as tetinas mais frequentemente (Blowey, 1999).

- Remoção das tetinas

A remoção das tetinas pode ser feita manual ou automaticamente. Quando a remoção das tetinas é feita manualmente, o ordenhador deve verificar de perto o fluxo de leite de cada vaca, e quando considerar que a ordenha foi concluída, deve desligar-se o vácuo antes de se remover as tetinas. Neste sistema, o ordenhador deve conhecer muito bem cada vaca, uma vez que a taxa de fluxo tende a variar, e caso o ordenhador não esteja atento pode ocorrer facilmente uma sobre ou sub-ordenha (Biggs, 2009).

Nos sistemas de remoção automática, o vácuo é desligado e a unidade de ordenha removida quando o fluxo de leite atinge um determinado limite (normalmente 200ml/minuto), sendo por isso menos frequente a sobre ou sub-ordenha (Biggs, 2009).

- Desinfecção dos tetos pós-ordenha (pós-dipping)

O uso de desinfetante nos tetos, após a ordenha, elimina a maioria das bactérias que se encontram na extremidade e na pele dos tetos. A maioria dos pós-dipping são formulados de

modo a permanecerem nos tetos durante 2 a 3 horas, e existem cinco tipos de compostos que podem ser usados: hipoclorito, iodóforo, clorexidina, compostos amónia quaternária e DDBSA (ácido dodecil benzeno sulfónico). Estas substâncias devem ser misturadas com plastificantes e emolientes como a glicerina, de modo a manter a pele dos tetos suave e resistente formando uma barreira protectora (Fernández, Ramírez, Chaves & Árias, 2008). Num estudo efectuado por Benavides e Hemling (2008), demonstrou-se que usando uma solução de iodo a 0,15% com 2 a 3% de emoliente obtém-se um efeito positivo sobre o estado de saúde dos tetos durante Invernos frios e secos. Por sua vez, Pedrini e Margatho (2003) consideram que a clorexidina é um produto bastante viável economicamente, uma vez que para além de ser um antiséptico de largo espectro e não irritante, apresenta um efeito cumulativo e contínuo, podendo ser utilizado com segurança no controlo de mastites contagiosas e ambientais.

Tem sido discutido se é melhor usar dip ou spray, sendo ambos os métodos utilizados na prática. No entanto, usando o dip observou-se uma melhor cobertura do teto, pelo que, quando se quer obter uma grande protecção parece ser mais seguro usar o dipp, o qual deve cobrir no mínimo 2/3 do teto (Blowey, 1999).

O uso de pós-dipping reduz em 50% a incidência de novas infecções, mas observa-se apenas uma redução de 14% quando as vacas já estão infectadas (Blowey, 1999). Também deve ser usado com o objectivo de proteger os tetos contra as moscas transmissoras de alguns agentes de mastites (Gradle, 2008).

É importante ainda referir que, apesar dos vários benefícios encontrados neste procedimento, alguns autores como Radostits *et al.* (2000) referem que, a eliminação dos agentes menores que se encontram nos tetos, como o *Corynebacterium bovis*, pode contribuir para o aumento da incidência de mastites.

- Desinfecção das tetinas entre vacas

A unidade de ordenha deve ser imersa numa solução desinfectante entre vacas ordenhadas, de modo a reduzir o número de bactérias no leite. De qualquer forma, é pouco provável que este acto seja efectivamente eficiente no combate à disseminação de agentes microbianos de vaca para vaca (Biggs, 2009).

- Leite residual

Independentemente do tempo que a unidade de ordenha permanece na vaca, nunca é removido todo o leite do úbere. Caso permaneça uma grande quantidade de leite no úbere, devido a uma sub-ordenha, aumenta a probabilidade de desenvolvimento de mastites

subclínicas. No entanto, é preciso ter em atenção que uma sobre-ordenha também pode ter efeitos muito nefastos para os tetos e glândulas mamárias, causando-lhes lesões que facilitam o aparecimento de mastites, pelo que é essencial estar atento ao aparecimento de sinais indicadores desta situação (descoloração dos tetos, aparecimento de um anel na base dos tetos, etc.) (Biggs, 2009). Segundo Rasmussen, Ronningen e Bjerring (2008), a sobre-ordenha não deve ultrapassar os 60 segundos, de modo a não haver alterações no estado de saúde dos tetos. Uma sub-ordenha pode influenciar a incidência de mastites, uma vez que as bactérias se mantêm no úbere e se multiplicam entre ordenhas (Edmondson, 2001).

- Ordem da ordenha

A ordem da ordenha é muito importante para ajudar a reduzir a disseminação de mastites. Primeiro devem ser ordenhadas as vacas recém-paridas (que em princípio estarão livres de infecção), seguindo-se as de alta produção, as de média produção e as de baixa produção. Depois são ordenhadas as vacas com altas CCS e, por fim, as vacas com mastites e vacas em tratamento (Biggs, 2009).

- Frequência da ordenha

A maioria das vacarias efectua 2 ordenhas por dia. No entanto, nas explorações com altas produções, já se ordenha 3 vezes por dia.

Quanto maior o número de ordenhas diárias, maior a produção de leite sem que haja efeitos significativos na composição do leite. Sabe-se que a incidência de mastites nas explorações que ordenham 3 vezes por dia tende a ser menor que nas explorações onde se ordenham apenas 2 vezes ao dia, havendo também uma significativa diminuição na CCS (Biggs, 2009). Como o aumento da frequência de ordenhas facilita a eliminação de bactérias do canal teto, a ordenha feita 3 vezes por dia é considerada, por alguns, a “melhor amiga” das vacas de alta produção (Blowey, 1999). É de referir, no entanto, a redução na longevidade destes animais expostos a uma exploração muito intensa.

- Intervalo entre ordenhas

O intervalo entre ordenhas é normalmente determinado por factores sociais, o que faz com que durante o dia o intervalo seja de aproximadamente 10 horas e à noite 14 horas. Quando o intervalo entre ordenhas é maior, há um aumento da produção, o que irá diluir as células somáticas presentes no leite, pelo que nas ordenhas da manhã a CCS é mais baixa (Biggs, 2009).

- Horário da distribuição dos alimentos

O canal do teto mantém-se aberto durante 20 a 30 minutos depois da ordenha, pelo que é essencial que as vacas se mantenham em pé durante este período, de modo a reduzir os riscos de entrada de microrganismos no canal do teto (Lévesque, 2004).

DeVries e Kyserlingk (2005) constataram que a tendência para as vacas se deitarem após a ordenha diminuíu 20 minutos quando se distribuía o alimento logo após a ordenha, comparativamente à distribuição de alimento 6 horas após a ordenha.

- Condições da máquina da ordenha

As condições da máquina de ordenha podem influenciar grandemente a incidência de mastites, podendo actuar como fomite, lesionando a extremidade do teto, criando forças de impacto, permitindo a colonização do canal do teto ou como resultado de sobre ou sub-ordenha (Edmondson, 2001). Alguns estudos sugerem que a máquina de ordenha, directa ou indirectamente, pode ser responsável por entre 6% a 50% das novas infecções observadas na glândula mamária (Herremans, 2006).

Como em tudo, é essencial haver uma boa higiene na máquina de ordenha, de modo a que a não seja ela a fonte de contaminação para outras vacas.

A máquina da ordenha também deve estar em boas condições para que não seja a causadora de traumatismos nos tetos. Por exemplo, se o nível de vácuo for elevado, aumentam as lesões no teto, mas se for insuficiente pode ocorrer refluxo de leite, o que poderá servir de fonte de contaminação para outros quartos (Biggs, 2009). Se as pulsações não tiverem momentos de descanso, podem ocorrer hemorragias nos tetos (Blowey, 1999). Quando as condições das tetinas não são as ideais, diminui a taxa de fluxo de leite e não há remoção da queratina em excesso, nem de bactérias que estão no canal do teto. As tetinas em más condições são a principal causa de lesões no teto. De facto, a existência de tetinas gretadas contribui não só para a lesão dos tetos, como ainda pode actuar como fomite, servindo assim de fonte de transmissão de mastites (Lévesque, 2004). É por isso importante cuidar bem da borracha das tetinas e substituí-la com frequência. É possível ainda prolongar a vida das tetinas que contêm borracha natural fervendo-as semanalmente numa solução cáustica para remover a acumulação de matéria orgânica, mas no caso de a borracha ser de origem sintética isto não deve ser feito, uma vez que prejudica a elasticidade do material (Haynes, 2001).

O nível de vácuo deve estar compreendido entre 32 e 50kPa e a fase de descanso da pulsação deve ser superior a 150 milisegundos (Rasmussen *et al.*, 2008).

As forças de impacto ocorrem quando existem diferenças de pressão entre a extremidade do teto e o colector, muitas vezes devido a “liner slip”. O “liner slip” corresponde ao afastamento

entre o teto e a tetina, havendo fuga de ar e perda do vácuo, o que leva a que haja refluxo de leite para dentro dos outros tetos e se produza um som característico (O’Callaghan, 1996). O “liner slip” conduz à entrada de ar pela parte superior das tetinas e, como ocorre essencialmente no final da ordenha, a extremidade do teto apresenta pouca resistência nesta altura e o canal do teto apresenta-se mais aberto. Desta forma, o leite ao penetrar no canal do teto tem maior probabilidade de se manter no úbere até à próxima ordenha (Edmondson, 2001).

Tudo o que cause alterações no funcionamento da máquina, como alterações no vácuo ou na fase de repouso das pulsações, provoca efeitos negativos na performance da ordenha e desconforto à vaca, pelo que estas situações devem ser evitadas (Kochman, Laney & Spencer, 2008).

Uma boa observação de alguns parâmetros pode ser suficiente para verificar o bom funcionamento da máquina da ordenha. Para isso basta observar a integridade dos tetos, a frequência de “liner slip”, o número de vacas que pontapeiam ou pisam a unidade de ordenha, o leite recolhido e o tempo de ordenha de cada vaca (Herremans, 2006). De qualquer modo, a máquina de ordenha deve ser verificada por pessoal especializado de seis em seis meses (Haynes, 2001).

3.6. Causas infecciosas

A mastite bovina é causada por vários agentes patogénicos, sendo os mais frequentes os agentes bacterianos. No entanto também podem surgir devido a outros microrganismos como as leveduras, micoplasmas e até algas. Mais raramente surgem os vírus como causa primária de mastite.

Os agentes de mastites podem ser classificados de acordo com a sua patogenia ou origem da infecção. Segundo o tipo de patogenia são classificados em agentes “maiores” ou “menores”. Os agentes maiores são aqueles que estão associados a mastites clínicas, grupo no qual estão incluídos o *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, coliformes (como por exemplo, *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp, *Citrobacter* spp.) e *Pseudomonas* spp. Outros agentes patogénicos como micoplasma, as prototecas e as leveduras, são também considerados agentes “maiores”. De uma forma sucinta, os agentes “maiores” são os que provocam um impacto considerável na saúde da vaca, na qualidade do leite e na produtividade (Zadoks & Fitzpatrick, 2009). Os agentes designados “menores” são aqueles que se encontram normalmente na pele do úbere e que podem ser considerados como fazendo parte da flora bacteriana do úbere. De qualquer

maneira, estes microrganismos apresentam uma interação muito complexa com o úbere e podem estar associados a elevadas CCS. Neste grupo estão incluídas as bactérias *Staphylococcus* coagulase negativo e *Corynebacterium bovis*. Estas bactérias produzem substâncias anti-bacterianas que podem proteger a glândula mamária de infecções por agentes maiores e exercer efeitos de inibição por competitividade (Biggs, 2009).

Quanto à origem da infecção podem ser considerados agentes ambientais ou contagiosos. Os microrganismos ambientais são os que residem no ambiente da vaca e podem influenciar a incidência de mastites contagiosas (Biggs, 2009). A exposição dos quartos a estes microrganismos pode ocorrer a qualquer momento da vida, principalmente no intervalo entre ordenhas, durante o período de secagem, antes do primeiro parto em novilhas e durante a ordenha. As fezes, o solo, as camas ou a água constituem os seus principais habitats. Os principais agentes que causam mastites ambientais são coliformes, como *E. coli* ou *Klebsiella* spp., espécies de *Streptococcus* como *Streptococcus uberis* e *Pseudomonas* spp.

Os microrganismos contagiosos são aqueles que se disseminam a partir de quartos infectados para os outros quartos ou para outras vacas. O principal habitat das bactérias causadoras de mastites contagiosas é o próprio úbere ou lesões do teto. Estes tipos de agentes estão mais associados a mastites crônicas ou subclínicas e a transmissão é feita através de fomites com leite contaminado, uso de panos comuns, mãos do ordenhador e pela máquina da ordenha. Os três principais agentes patogénicos causadores de mastites contagiosas são *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Mycoplasma* (Biggs, 2009), que são assim classificados devido ao seu elevado grau de contágio e às grandes alterações que podem provocar na glândula mamária. Estes agentes têm a reputação de provocar surtos em que um grande número de animais fica infectado num curto espaço de tempo (Britten, 2006). Um melhor conhecimento de como estes agentes contagiosos estão associados a práticas de ordenha e manejo das explorações pode ajudar na redução de prevalência destes microrganismos (Lombard, Slyke, Welcome, Schukken & Koprál, 2008).

Quanto aos agentes virais, algumas mastites têm sido associadas a herpes vírus bovino 1 (BHV-1) e 4 (BHV-4), febre aftosa (FMDV) e parainfluenza 3 (PI3), no entanto a sua importância como causadores de mastites é mínima (Roberson, 2008).

3.6.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é o agente que mais frequentemente origina mastites contagiosas nas vacas de leite, e a sua prevalência não parece estar relacionada com o tamanho da exploração ou região onde se localiza (Lombard *et al.*, 2008). Nos últimos 25 anos a prevalência deste

tipo de mastites tem diminuído nas vacarias que adoptam programas de controlo de mastites (Radostitis *et al.*, 2000).

As mastites causadas por *Staphylococcus aureus* são, na sua maioria, de carácter crónico e de natureza subclínica, com mastites clínicas intermitentes (Biggs, 2009).

Características laboratoriais: crescimento em placas de agar sangue ou num meio selectivo como Baird Parker; colónias de 3-4mm; colónias amarelas e geralmente hemolíticas; cocos Gram-positivos, catalase positivos e coagulase positivos (alguns podem ser coagulase negativos) (Biggs, 2009).

Este agente coloniza o canal do teto e lesões da pele do teto, podendo no entanto sobreviver noutros locais do corpo da vaca (essencialmente no jarrete) ou mesmo no ambiente (Capurro, Waller, Aspàn, Unnerstad & Artursson, 2008). A sua transmissão ocorre principalmente durante as ordenhas através das tetinas ou mãos de ordenhadores contaminadas (Biggs, 2009). As moscas são um veículo importante de transmissão de *S. aureus* para as novilhas, durante o pré-parto (Radostitis *et al.*, 2000). Alguns autores como Tirian *et al.* (2008) e George, Divers, Ducharme e Welcome (2008) consideram que as novilhas também podem ser infectadas, enquanto vitelas, a partir da ingestão de colostro contaminado ou de leite com *S. aureus*. De qualquer modo, não existe nenhum estudo científico fidedigno que comprove esta teoria. Em algumas explorações, este agente pode ser introduzido a partir de novilhas recentemente adquiridas (Biggs, 2009).

Estes microrganismos produzem 3 hemolisinas (α , β , δ), sendo apenas a α e a β verdadeiras toxinas. A maioria dos isolados de *S. aureus* em vacas produz toxinas β ou uma combinação entre toxinas α e β . A toxina β causa lesões nas células epiteliais da glândula mamária, aumenta os danos causados pela toxina α e aumenta a aderência do *S. aureus* às células epiteliais da glândula mamária e a sua proliferação. A maioria das estirpes produz coagulase que converte fibrinogénio em fibrina, o que favorece a invasão dos tecidos. Também a leucocidina produzida por *S. aureus* pode inactivar os neutrófilos (Radostits *et al.*, 2000). De qualquer maneira é importante salientar que existem estirpes de *S. aureus* que são mais resistentes à fagocitose e à morte, do que outros (Aslantas *et al.*, 2007).

Num estudo efectuado por Graber (2008) obtiveram-se 17 genótipos diferentes de *S. aureus*, mas apenas um dos genótipos (genótipo B) estava associado a casos de alta contagiosidade e patogenicidade, enquanto que todos os outros apenas causavam infecções esporádicas. Noutro estudo efectuado por Kalorey, Shanmugam, Kurkure, Chousalkar e Barbuddhe (2007) obtiveram-se 37 genótipos diferentes.

Apesar da presença de *S. aureus* no leite poder ser um risco para os consumidores devido à sua capacidade de produzir enterotoxinas que levam a intoxicações alimentares, de acordo

com um estudo efectuado por Oliveira, Rodrigues, Hulland e Ruegg (2008) são poucas as estirpes de *S. aureus*, isolados de casos de mastites subclínicas, que expressam enterotoxinas e, por isso, com impacto na saúde pública. De qualquer maneira esta bactéria pode ser considerada uma ameaça de potencial biológico, porque pode ser produzida em grandes quantidades, as suas toxinas são relativamente estáveis para inactivação química e física, e pequenas quantidades de toxinas (<1mg) poderem desencadear sintomas de choque tóxico (Srinivasan *et al.*, 2006).

Existem vários factores de risco que influenciam a prevalência da infecção por este agente, nomeadamente: introdução de vacas infectadas, inadequada desinfeção pós-ordenha, má higiene na preparação dos tetos, transmissão através das tetinas, mau diagnóstico dos casos clínicos, tratamento inadequado, mau desenho e funcionamento da sala de ordenha, má limpeza da sala de ordenha, inadequado tratamento das vacas secas e má política de refugo (Biggs, 2009).

Este microrganismo danifica o sistema de ductos, originando infecções pustulosas profundas no tecido glandular, seguidas de formação de abscessos. Numa primeira fase da infecção os danos glandulares são mínimos e reversíveis, no entanto, os abscessos podem libertar *S. aureus* que iniciam o processo de infecção noutras zonas da glândula mamária com formação de mais abscessos e alterações irreversíveis nos tecidos glandulares, que podem, por sua vez, ser detectados por palpação do úbere ou por observação visual (Biggs, 2009).

As mastites causadas por este agente originam grandes alterações no tecido glandular e as quebras na produção de leite podem atingir os 50% (Lévesque, 2004). Existe uma grande flutuação na CCS e uma intermitente excreção durante a infecção. A flutuação na CCS ocorre porque numa primeira fase as bactérias são mortas pelo sistema imunitário, reduzindo-se assim o desafio que causou o aumento das células somáticas, e por isso mesmo, diminuindo a CCS. Como a resposta do sistema imunitário abranda, torna-se possível que as bactérias sobreviventes se multipliquem, provocando um novo aumento da CCS. A excreção intermitente de *S. aureus* ocorre porque esta bactéria pode resistir à fagocitose dos neutrófilos, permanecendo no interior das células epiteliais até que ocorra a sua morte. Como seria de esperar, isto tem um grande impacto na sensibilidade de culturas bacteriológicas, uma vez que nos casos subclínicos é bastante frequente existirem falsos negativos (Biggs, 2009).

Para se aumentar a sensibilidade na detecção de *S. aureus* é aconselhável fazer uma pré-cultura e repetir a amostragem. Quando se usa apenas uma amostra a sensibilidade é de 75%, quando se usam 2 amostras a sensibilidade aumenta para 94% e quando se usam 3 a sensibilidade passa a ser de 98%. Pensa-se que o congelamento da amostra também possa

melhorar a taxa de detecção de *S. aureus*, uma vez que há libertação das bactérias do interior das células (Biggs, 2009).

As infecções por *S. aureus* são bastante difíceis de combater devido à existência de abscessos que protegem a bactéria contra os mecanismos de defesa da vaca e contra a acção dos antibióticos (Lévesque, 2004). Outra causa da fraca resposta aos antibióticos prende-se com o facto de o *S. aureus* ser capaz de sobreviver no interior de células como células epiteliais, e os antibióticos serem incapazes de penetrar no interior destas (Blowey & Edmondson, 1999).

Algumas estirpes de *S. aureus* causam mastites gangrenosas hiper-agudas caracterizadas por uma coloração azulada ou negra do quarto, em forma de “blue bag”, e uma diminuição da temperatura do mesmo (Philpot & Nickerson, 1991). Estas mastites gangrenosas resultam de trombozes que ocorrem no quarto (Archbald, 1999), e caso seja efectuado um tratamento atempadamente pode evitar-se a morte destes animais (Tyler & Cullor, 2008), sendo provável a perda do quarto afectado (Fig. 1).

Fig. 1 – Vaca com mastite gangrenosa



Normalmente a severidade da infecção relaciona-se com a fase da lactação em que as vacas se encontram quando são infectadas. Os casos crónicos resultam de infecções no período seco ou no fim da lactação, enquanto nos casos mais graves, em que há reacções sistémicas e morte, a infecção ocorre no início da lactação (Archbald, 1999).

É bastante difícil conseguir a sua erradicação, mas com os devidos cuidados e colocando em prática medidas de controlo como uma boa desinfecção dos tetos, tratamento das vacas secas, bom diagnóstico e refugo das vacas infectadas, pode-se reduzir o aparecimento de novas infecções a 5% das vacas e em 2% dos quartos (Lévesque, 2004).

3.6.2. *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae foi reportado pela primeira vez em 1887, por Nocard e Mollereau como causa de mastite bovina (Biggs, 2009), sendo considerado o agente que maiores perdas provoca na produção de leite das vacas afectadas (Teixeira, Ribeiro & Simões, 2008).

Este agente é responsável por infecções também no homem e, apesar do reservatório bovino ser o úbere infectado, não existem dados definitivos comprovando a transmissão do agente entre o homem e os animais (Santos, Brito, Lange, Brito & Cerqueira, 2007).

Características laboratoriais: crescimento em placas de agar sangue e agar Edwards; colónias com 1-2mm, lisas, translúcidas e convexas; beta-hemolíticos, cocos Gram-positivos e catalase negativos, e pertencentes ao grupo B Lancefield (Biggs, 1999).

Streptococcus agalactiae é um parasita obrigatório da glândula mamária e é extremamente contagioso. É tão contagioso que uma simples infecção de uma vaca pode contagiar metade do efectivo (Lévesque, 2004).

S. agalactiae é o agente menos frequentemente isolado quando se cumprem todas as boas práticas de ordenha (Lombard *et al.*, 2008), uma vez que a sua sobrevivência no ambiente é rara. A transmissão ocorre principalmente através das tetinas contaminadas, das mãos dos ordenhadores ou dos panos de limpeza dos tetos (Biggs, 2009).

Estes agentes infectam a cisterna e sistema de ductos da glândula mamária, onde causam inflamação. Inicialmente há uma rápida multiplicação de *S. agalactiae* nos ductos galactóforos, seguida da passagem da bactéria para os vasos linfáticos e linfonodos supramamários. Nesta fase vários neutrófilos migram para os ductos da glândula mamária e a acumulação de detritos bacterianos intensifica a resposta inflamatória, o que resulta na destruição do tecido glandular e consequentemente diminui a produção de leite, podendo levar mesmo à agalaxia (Radostits *et al.*, 2000).

A virulência das diferentes estirpes de *S. agalactiae* deve-se à sua capacidade de aderirem ao tecido da glândula mamária, e o mecanismo usado para penetrar o canal do teto é mais influenciado pelo diâmetro do que pela extensão do canal (Radostits *et al.*, 2000).

Normalmente causam mastites subclínicas com surtos de mastites clínicas periódicas (Lévesque, 2004).

S. agalactiae é introduzido numa vacaria através da compra de animais infectados, e nas vacarias em que há um acompanhamento bastante próximo, é possível identificar a infecção logo após a sua introdução na exploração, quer porque se nota um aumento dramático na CCS quer porque se isola o agente nas análises bacteriológicas feitas por rotina. Segundo Biggs (2009), já existem várias vacarias que realizam análises bacteriológicas por rotina de três em três meses.

S. agalactiae raramente causa mastites severas, no entanto a longo prazo pode ocorrer fibrose no quarto afectado e este deixar de ser produtivo nas lactações seguintes (Archbald, 1999). De qualquer maneira, uma ordenha incompleta ou a não utilização de pós-dipping após a ordenha pode aumentar a severidade de mastites causadas por este agente (Radostits *et al.*, 2000).

Normalmente apenas é afectado um quarto, mas não é raro aparecerem vários quartos afectados numa vaca, principalmente se *S. agalactiae* for endémico na vacaria há vários anos (Biggs, 2009).

A maioria das vacas infectadas não apresenta sinais clínicos característicos, mas é comum observarem-se elevadas CCS e uma diminuição na produção de leite nas mastites subclínicas (Lévesque, 2004). Em alguns casos as mastites subclínicas evoluem para mastites clínicas e aí há uma grande subida na CCS, sendo característico destas infecções a excreção intermitente do agente (Biggs, 2009).

Este é o agente contra o qual os antibióticos apresentam maior eficácia durante a lactação (80-90%) e durante o período de seca. Geralmente são muito sensíveis à penicilina. Quando a infecção se encontra estabelecida há algum tempo, a taxa de cura é mais baixa. De qualquer forma este é um agente que se consegue erradicar completamente de uma vacaria, principalmente se o tratamento de seca se for feito por rotina, tendo-se tornado cada vez menos comum (Lévesque, 2004). No entanto, deve ter-se em atenção ao facto da infecção se espalhar muito rapidamente, e se apenas se tratarem as vacas no período seco, irá ocorrer re-infecção durante a lactação na sala de ordenha. Por isso, existem várias abordagens possíveis a este problema: por um lado, podem tratar-se todas as vacas (em lactação e secas) e todos os quartos simultaneamente com antibióticos, podem-se identificar e tratar apenas as vacas infectadas ou então confiar totalmente nas boas práticas de manejo para controlar e, eventualmente, erradicar *S. agalactiae* (Biggs, 2009).

3.6.3. *Mycoplasma*

Mycoplasma era considerado até há pouco tempo o agente contagioso menos comum. No entanto, em alguns estudos recentes, tem sido bastante isolado em vacarias de grandes dimensões e está associado ao manejo dessas explorações (Lombard *et al.*, 2008).

Existem onze espécies de *Mycoplasma* e *Acholeplasma* que foram isoladas do leite: *M. alkalescens*, *M. arginini*, *M. bovirhinis*, *M. capricolium*, *M. canadenses*, *M. dispar*, *M. bovis*, *M. californicum*, *M. bovis genitalium*, *Acholeplasma laidlawii* e *Acholeplasma axanthum* (González & Wilson, 2003). No entanto, *Mycoplasma bovis genitalium*, *M. californicum* e *M. bovis* são referidos pelos autores como sendo extremamente contagiosos e capazes de se

propagar rapidamente num efectivo (Blowey & Edmondson, 1999), podendo ser responsáveis por mastites clínicas, subclínicas ou crónicas (González, 2006).

M. bovigentialium causa uma mastite relativamente ligeira. *M. californicum* dá origem a mastites crónicas em que o quarto fica duro e existe uma quebra brutal na produção de leite. Nestes casos o leite apresenta-se com coágulos semelhantes a pús e a contagem de células somáticas atinge valores extremamente elevados (entre os 5 e os 10 milhões). *M. bovis* causa o síndrome mais severo, em que para além da mastite, a vaca pode-se apresentar com outras patologia como aborto, infertilidade, artrites, queratoconjuntivite, otite média, pneumonia ou abscessos subcutâneos (González & Wilson, 2003). Nas mastites por *M. bovis* os quartos infectados podem estar inchados e o leite pode apresentar apenas alguns “farrapos”, mas também pode variar desde um leite aguado até um leite rosado com uma textura grossa e arenosa (Lévesque, 2004). Num estudo efectuado por Ruhnke, Thawley e Nelson (1976), 24 horas após a queda inicial da produção de leite, verificou-se um ligeiro espessamento do leite com presença de alguns “farrapos”. A secreção amarelada foi-se tornando pálida e de consistência creme espesso, tornando-se gradualmente purulenta, com coágulos grandes. Estas características são consideradas típicas de uma mastite por *Mycoplasma bovis*.

A sua introdução numa vacaria faz-se essencialmente através da compra de animais infectados, uma vez que a infecção por *Mycoplasma* pode persistir durante um longo período de tempo no úbere (até 13 meses) sem que haja sinais evidentes de infecção (Radostits *et al.*, 2000).

Vacas de todas as idades e em qualquer fase da lactação são susceptíveis à infecção por *Mycoplasma* (González & Wilson, 2003).

A transmissão dentro de um efectivo normalmente ocorre através do uso de seringas e cânulas comuns no tratamento de mastites ou através da contaminação dos tetos durante a ordenha, embora também tenha sido sugerido que a inalação pode ser causa da infecção (Radostits *et al.*, 2000). O autor Fox (2006) sugere que há transmissão hematogénea ou linfática de um quarto infectado para os outros ou mesmo a partir de outra zona do organismo infectada com *Mycoplasma*.

Mycoplasma não é detectado pelas culturas microbiológicas que são usadas de rotina, pelo que se deve suspeitar de mastites por este agente quando a produção diminui bruscamente e as culturas microbiológicas de casos de mastites clínicas são negativas (Lévesque, 2004). A sensibilidade das culturas microbiológicas é afectada pela excreção intermitente deste agente nas infecções crónicas, pelo baixo nível de excreção no leite nas infecções latentes, pela colheita asséptica da amostra para evitar contaminações e pelas condições de armazenamento (González, 2006). Outro dos grandes problemas na sua detecção é que *Mycoplasma* é muito

sensível a alterações no pH do leite, pelo que é necessário que a amostra seja de leite fresco e que se usem técnicas especiais de cultura (Biggs, 2009). Por isso, quando se suspeita de mastite por *Mycoplasma*, mesmo que os resultados sejam negativos deve-se repetir a análise ao leite de modo a confirmar a ausência deste agente (Britten, 2006).

As colónias são de crescimento lento (demoram sete a dez dias a crescer) e têm a forma típica de “ovo estrelado” quando crescem em agar sangue (Biggs, 2009). No entanto, é importante referir que a *Acholeplasma laidlawii* e as formas L das bactérias também podem produzir colónias em forma de “ovo estrelado”, pelo que é essencial diferenciar estes organismos de *Mycoplasma*. As colónias de *Mycoplasma* podem ser identificadas ao nível da espécie através de métodos serológicos, como a imunofluorescência, o teste indirecto de imunoperoxidase com discos brancos ou a PCR (*Polimerase Chain Reaction*) (González, 2006).

O tratamento de mastites por *Mycoplasma* é difícil uma vez que este organismo não é uma bactéria semelhante às outras e só alguns antibióticos são eficazes (Blowey, 1999). Se for detectado *Mycoplasma* no leite do tanque devem-se testar todas as vacas e, uma vez que a infecção se mantém para o resto das suas vidas, é aconselhável refugar as vacas infectadas de modo a erradicar este agente (Lévesque, 2004). Apesar de algumas vacas recuperarem a produção de leite na lactação seguinte após o tratamento, muitos animais permanecem portadores de *Mycoplasma* (González & Wilson, 2003). Para controlar a infecção e não permitir a ocorrência de novas infecções, é essencial ter cuidado na desinfecção dos tetos e na higiene quando se usam tratamentos intra-mamários, bem como refugar os animais infectados (Archbald, 1999).

3.6.4. *Streptococcus dysgalactiae*

Streptococcus dysgalactiae é considerado, por alguns autores, um agente ambiental com alguma transmissão por contágio (Biggs, 2009), enquanto outros o consideram apenas como agente contagioso (Blower, 1999).

Características laboratoriais: crescimento em agar sangue e em agar Edwards, colónias com 1-2mm, regulares, translúcidas e convexas, as colónias são duras, não viscosas e podem ser empurradas através do agar; normalmente alfa-hemolíticas; cocos Gram-positivos, catalase negativos e pertencentes ao grupo C Lancefield (Biggs, 2009).

A transmissão ocorre essencialmente quando os tetos entram em contacto com fezes, solo ou camas contaminadas e quando a preparação dos tetos para a ordenha é deficiente (Biggs, 2009).

Esta bactéria é encontrada no ambiente e pode permanecer nele durante um longo período (Tyler & Cullor, 2002), tendo sido isolada da boca, das amígdalas e vagina das vacas (Radostits *et al.*, 2000).

Streptococcus dysgalactiae está associado a um mau estado de saúde dos tetos, sendo frequentemente isolado em tetos gretados ou com feridas (Biggs, 2009).

Uma vez que este agente pode estar presente nas amígdalas, os animais podem infectar os tetos quando os lambem. Pensa-se que esta seja a causa provável de isolamento em novilhas e vacas secas (Teixeira *et al.*, 2008).

Factores de risco: mau funcionamento da máquina de ordenha que leva a danos nos tetos, más condições dos tetos, danos físicos nos tetos e tratamento inadequado no período seco (Biggs, 2009).

Existem diferentes serótipos e cada um tem diversos factores anti-fagocíticos, nos quais estão incluídos a proteína M-like, α_2 -macroglobulinas, cápsula e fibronectina. Os factores de virulência incluem a hialuronidase e a fibrinolisinase (Radostits *et al.*, 2000).

Os casos clínicos de *Streptococcus dysgalactiae* tendem a ser esporádicos e relativamente fáceis de tratar. Normalmente é mais frequente no início da lactação, devido a infecção durante o período seco e tendem a durar menos de um mês (Lévesque, 2004). No entanto, algumas infecções podem tornar-se persistentes, o que resultará num aumento da CCS. Nestas infecções pode ocorrer a transmissão por contágio (Biggs, 2009).

Streptococcus dysgalactiae também pode ser isolado nos casos de mastites de Verão, juntamente com as outras bactérias que originam esta mastite (Biggs, 2009).

Apesar de em alguns casos ocorra a cura espontânea é aconselhável o tratamento com antibióticos nos casos clínicos. O tratamento durante o período seco é normalmente eficaz e previne novas infecções no início da secagem (Lévesque, 2004).

3.6.5. *Corynebacterium bovis*

Corynebacterium bovis é provavelmente o agente mais frequentemente isolado no leite, uma vez que vive no canal do teto (Biggs, 2009). Este agente é contagioso, mas a severidade da infecção é moderada, pelo que tem pouco impacto na CCS e na taxa de mastites clínicas (Lévesque, 2004).

Alguns estudos têm demonstrado que esta bactéria pode ter algum efeito de protecção contra os agentes “maiores”, provavelmente devido à inibição por competitividade, a efeitos antagonistas ou à produção de substâncias anti-microbianas (como bacteriocina) (Biggs, 2009).

Quando é isolado *Corynebacterium bovis* no leite do tanque, deve ter-se em conta que pode ser indicativo da falta de desinfecção do teto ou ineficácia do produto (Tyler & Cullor, 2008). *Corynebacterium bovis* é um microrganismo muito lipofílico, o que significa que cresce bem na gordura encontrada no leite. É importante referir que as colónias em agar sangue são bastante pequenas (polverulentas) e demoram 48 horas a crescer. Por isso, quando existe um crescimento significativo de outros agentes patogénicos na mesma placa, facilmente esta bactéria pode passar despercebida (Biggs, 2009).

Medidas preventivas, como uma eficiente desinfecção do teto e um correcto tratamento das vacas no período seco, são normalmente suficientes para controlar esta infecção (Lévesque, 2004).

3.6.6. Coliformes

Os coliformes têm origem no tracto intestinal dos animais e podem ser encontrados no estrume que contamina as camas, o solo e a água (Lévesque, 2004).

Os coliformes causadores de mastites incluem *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter* e *Citrobacter* (Blowey, 1999).

Normalmente, a infecção ocorre após o parto ou no início da lactação (Lévesque, 2004).

Características laboratoriais: crescimento em agar sangue ou em meios selectivos como McConkey, colónias cinzentas claras de 2-5mm, podem ser hemolíticos ou não, Gram-negativos e os fermentadores de lactose (*Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter aerogenes* e *Citrobacter*) dão origem a colónias cor-de-rosa em placas de meio McConkey (Biggs, 2009).

A infecção subclínica é comum, mas normalmente de curta duração. Quando dão origem a mastites clínicas, a maioria das vezes a severidade é moderada, existindo, no entanto, casos bastante graves (Lévesque, 2004).

Segundo Radostits *et al.* (2000), as vacas com baixas CCS estão mais predispostas a mastites por coliformes, assim como as vacas que se encontram em vacarias com baixa incidência de infecções intra-mamárias por *Streptococcus* e *Staphylococcus*. Outro factor de risco para desenvolvimento de mastites por coliformes é o Síndrome de vaca caída, devido à grande contaminação a que o úbere e os tetos estão sujeitos por contacto prolongado com as fezes e com o material da cama.

As mastites clínicas são caracterizadas pelo aparecimento de leite aguado e amarelado (Fig. 2). As bactérias produzem endotoxinas que rapidamente levam ao aparecimento de sinais de inflamação do úbere, acompanhado por febre e sinais sistémicos de toxémia. Os coliformes podem levar à perda do quarto e à própria morte da vaca em apenas 6 a 8 horas após o

aparecimento dos sinais clínicos. No entanto, na maioria das vezes, a vaca recupera em 24 a 48 horas. Em alguns casos, a infecção por estes microrganismos também se pode tornar crónica, com alguns períodos de expressão clínica (Lévesque, 2004).

Fig. 2 – Leite de mastites por coliformes



Na maioria das vezes, o número de bactérias é bastante baixo ou mesmo ausente quando ocorrem os sinais clínicos de mastite, pelo que pode haver ausência de crescimento de bactérias nas culturas microbiológicas (Lévesque, 2004).

Uma vez que pode ser a endotoxina que está a causar os sinais clínicos, os antibióticos podem ser inúteis nestes casos (Lévesque, 2004).

É importante ter em conta que normalmente um elevado nível de coliformes no leite do tanque não é causado por mastites, mas sim por contaminação do leite com esterco, devido a uma má higiene na ordenha (Lévesque, 2004).

- *E. coli*

E. coli é o agente ambiental mais prevalente nas explorações e, por isso mesmo, o agente ambiental que mais provoca mastites. *E. coli* está presente nas fezes, no solo e nas camas em grande número, no entanto, quando a higiene é baixa o seu número aumenta exponencialmente. Uma má ventilação e uma sobrelotação animal podem aumentar a prevalência deste agente, o que resultará numa incidência de novas mastites (Biggs, 2009).

Normalmente, as infecções por *E. coli* são consideradas infecções oportunistas e de curta duração. Os factores de virulência associados aos diferentes serótipos de *E. coli* incluem as adesinas, as toxinas, a parede celular, a cápsula e a resistência ao sistema imunitário (Güler & Gündüz, 2007). Os sinais sistémicos que ocorrem nas mastites clínicas devem-se essencialmente aos lipopolissacáridos (LPS) da parede, também chamado endotoxina, que é

libertado quando o sistema imunitário destrói as bactérias invasoras. Esta endotoxina provoca grandes alterações na permeabilidade e aumenta as células somáticas na glândula mamária e no leite, resultando em edema, depressão, toxémia e outros sinais severos típicos de mastite aguda ou hiper-aguda (Ribeiro *et al.*, 2008), podendo mesmo ser fatal (Biggs, 2009). Nos casos de mastites moderadas por *E. coli*, a infecção é normalmente auto-limitante e, muitos destes casos, nem necessitam de tratamento antimicrobiano (Biggs, 2009).

Enquanto umas vacas desenvolvem mastites clínicas, outras apenas apresentam uma pequena resposta inflamatória, com um aumento transitório na CCS. Nas mastites clínicas, o quarto apresenta-se quente, duro e inchado, com leite aquoso ou seroso (Biggs, 2009). Recentemente têm sido reportados alguns casos de mastite crónica (Schukken *et al.*, 2004), em que as vacas se encontram contaminadas por *E. coli* e eliminam a bactéria sem que haja sinais aparentes (Biggs, 2009).

As mastites podem ocorrer em mais do que um quarto, mas por ser um agente ambiental, é mais frequente afectar os quartos posteriores (Biggs, 2009).

O sucesso do tratamento depende da gravidade dos sintomas, da resistência da vaca e da prontidão do tratamento (Biggs, 2009).

- *Klebsiella*

Klebsiella pertence à família das Enterobacteriaceae (Henton, 2004) e foi identificada como agente de mastite, há bastante tempo. As espécies identificadas no leite são *Klebsiella pneumoniae* e *K. oxytoca* (Zadoks & Munoz, 2007).

K. pneumoniae tem sido reportada em diferentes países como causa de surtos de mastites clínicas, principalmente nas duas primeiras semanas de lactação, sofrendo o úbere alterações semelhantes às causadas por mastites por *E. coli* (Ribeiro *et al.*, 2008).

Este agente está associado a camas de serradura, essencialmente quando esta se encontra armazenada em locais húmidos e quentes (Blowey, 1999). Num estudo realizado por Munoz, Ahlström, Rauch e Zadoks (2006) observou-se que mais de 80% das amostras fecais eram positivas a *Klebsiella*, pelo que a contaminação fecal do ambiente também pode estar associado a mastites por este microrganismo. *Klebsiella* também se encontra presente na comida, na água e até mesmo nas pernas das vacas e na pele dos tetos (Zadoks, Munoz, Griffiths, Bennett & Schukken, 2008b). De qualquer maneira, a existência deste agente na comida parece estar mais associado a contaminação fecal, do que a contaminação do alimento na origem (Zadoks *et al.*, 2008a).

Num estudo efectuado por Ribeiro *et al.* (2008) uma vaca com uma mastite clínica por *Klebsiella* apresentava sinais sistémicos como pirécia (41°C), polipneia, anorexia, estase

ruminal, tremores, taquicardia e depressão. Os quartos infectados apresentavam-se quentes, inchados, dolorosos, com extremidade dos tetos frias e descoradas (vermelhas ou azul escuras) (Fig. 3), e os linfonodos mamários estavam aumentados. Estas mastites hiper-agudas ocorrem devido à absorção de endotoxina, levando a sinais graves de toxémia (Henton, 2004). Em alguns surtos tem havido evidência de transmissão por contágio (Biggs, 2009).

Fig. 3 – Extremidades dos tetos descoradas



- *Serratia*

Das espécies que causam mastites, *Serratia marcescens* tem sido a mais frequentemente isolada. Esta bactéria Gram-negativa tem sido isolada da água, solo, comida, materiais da cama e até no dip usado para desinfectar os tetos (Bannerman *et al.*, 2004).

Num caso descrito por Ollis e Schoonderwoerd (1989), um surto de mastites causadas por *Serratia marcescens* e *Pseudomonas aeruginosa* parece ter sido causado por sobre-ordenha e ordenha de tetos molhados.

As mastites causadas por *Serratia marcescens* são normalmente subclínicas ou com sinais clínicos ligeiros, tendendo a tornar-se uma infecção crónica (Bannerman *et al.*, 2004). Num estudo realizado por Todhunter, Smith e Hogan (1991), 80% das infecções intramamárias causadas por *Serratia* spp. foram identificadas no período seco e, apesar de animais de todas as idades poderem ser afectados, as vacas mais velhas apresentaram maior susceptibilidade a mastites por *Serratia* spp.

O diagnóstico pode ser complicado devido ao carácter subclínico da infecção, podendo também ser identificado no leite como resultado de contaminação do mesmo, e não devido a mastites (Todhunter *et al.*, 1991).

A maior preocupação associada a estas mastites reside no facto destas bactérias terem demonstrado ser resistentes a um grande número de antibióticos (Bannerman *et al.*, 2004). No entanto, é frequente ocorrer a eliminação espontânea do agente (Todhunter *et al.*, 1991).

3.6.7. *Pseudomonas*

Pseudomonas são bactérias não fermentadoras de lactose que causam mastites clínicas severas ou mastites crônicas (Biggs, 2009). As espécies mais isoladas têm sido *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa* (Nam *et al.*, 2009), sendo responsáveis por menos de 1% das infecções intra-mamárias (Kawai *et al.*, 2008).

Normalmente provocam a inflamação do quarto infectado e a presença de coágulos brancos irregulares no leite, os quais são muito semelhantes aos encontrados nas infecções por *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Esta bactéria consegue desenvolver-se no interior das células do úbere, o que torna o tratamento com antibiótico pouco eficaz. A maioria dos casos permanece durante dias ou semanas, ocorrendo frequentemente uma recaída passados alguns dias. Algumas vacas desenvolvem mastites crônicas, com perda de peso (Biggs, 2009). Segundo Erskine, Wagner e DeGraves (2003), *Pseudomonas aeruginosa* pode ser isolada do quarto infectado 12 meses após a realização de um tratamento inicial. É dos agentes onde se têm verificado um aumento das multiresistências, o que também dificulta o tratamento das mastites causadas por *Pseudomonas* (George *et al.*, 2008).

Este organismo está fortemente associado à contaminação da água que depois é utilizada na lavagem dos tetos e da máquina de ordenha ou quando as cânulas usadas nos tratamentos intra-mamários se encontram contaminadas (Kawai *et al.*, 2008).

Nas vacas recém-paridas a infecção por *Pseudomonas* spp. pode dar origem a mastites clínicas muito graves, que podem mesmo levar à morte do animal (Blowey, 1999).

3.6.8. *Proteus*

Proteus spp. é referido na maioria das vezes como contaminante e não tanto como causa de mastites. Esta bactéria é frequentemente encontrada nas camas, na comida e na água e o leite exala um cheiro bastante característico (Biggs, 2009).

3.6.9. *Pasteurella*

As mastites causadas por *Pasteurella* spp. são raras na vaca. No entanto, podem ocorrer casos de toxémia e de gangrena (Archbald, 1999).

3.6.10. *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN)

Os *Staphylococcus* coagulase negativos são agentes considerados comensais, sendo normal encontrá-los na pele dos tetos e do úbere. Apesar disso, algumas espécies têm capacidade de colonizar o canal do teto (Biggs, 2009).

Características laboratoriais: crescimento em placas agar sangue; colónias brancas de 3-4mm, normalmente não hemolíticas; cocos Gram-positivos, catalase positivos e coagulase negativos (Biggs, 2009).

As espécies mais frequentemente isoladas nas infecções intra-mamárias são *Staphylococcus chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hyicus*, *S. simulans* e *S. xylosus* (Thorberg, 2008).

Os SCN normalmente são referidos como agentes “menores”, o que significa que a sua patogenicidade é baixa ou mesmo ausente (Biggs, 2009). De qualquer maneira, não se sabe ao certo porque é que algumas espécies são mais propensas a causar mastites persistentes do que outras. Pensa-se que possa estar relacionado com diferentes factores de virulência e/ou adaptação ao ambiente do úbere (Thorberg, 2008).

Num estudo efectuado por Thorberg (2008), *S. epidermidis* foi mais isolado em vacas multíparas, enquanto que o *S. chromogenes* foi isolado em mastites de vacas primíparas.

Esta bactéria é a mais prevalente nas vacarias de alta produção, em que tenha sido implementado com sucesso um plano de controlo contra os agentes considerados maiores (Lévesque, 2004).

As infecções por SCN estão presentes em 10 a 20% dos quartos e a infecção é mais frequente no início da lactação. No entanto, algumas semanas após o parto há um grande declínio que resulta na cura espontânea da infecção. Não se sabe ao certo porque é que a vaca se infecta e porque é que há esta cura espontânea, mas pensa-se que a ordenha possa ajudar na eliminação deste agente (Biggs, 2009).

Uma cultura contendo SCN, nem sempre significa que exista mastite, podendo haver contaminação da amostra com microrganismos que se encontram na pele dos tetos e do úbere (Biggs, 2009).

Uma vez que os SCN são agentes poucos patogénicos, é mais frequente haver infecções subclínicas, apesar de também haverem casos de mastites clínicas. É importante ainda referir que as novilhas recém-paridas são normalmente mais afectadas (Biggs, 2009).

Os SCN podem dar origem a infecções persistentes, em que há um aumento na CCS. Para além do aumento na CCS, a infecção por SCN também pode provocar alterações no tecido da glândula mamária que levam a uma diminuição da produção de leite (Taponen & Pyörälä, 2007).

Na maioria das vezes não é aconselhável a antibioterapia durante a lactação, sendo suficiente o uso de pós-dipping e o tratamento no período seco para controlar estes agentes (Lévesque, 2004). No entanto, Piepers, Barkema, Kruif, Opsomer e Vliegheer (2008), não recomendam o tratamento com antibióticos durante o pré-parto, no caso das novilhas, uma vez que muitos

destes animais com SCN parecem não apresentar mastites. Num estudo verificou-se a cura espontânea em 44% das mastites por SCN (Deluyker, Oye & Boucher, 2005).

3.6.11. *Streptococcus uberis*

Até há poucos anos *Streptococcus uberis* era considerado um agente ambiental, associado particularmente a camas de palha. No entanto, hoje em dia já se sabe que algumas estirpes podem ter um comportamento contagioso (Biggs, 2009).

Características laboratoriais: crescimento em agar sangue, agar Edwards e meio de McConkey; colónias de 1-2mm, lisas, translúcidas e convexas; normalmente são não-hemolíticas ou parcialmente alfa-hemolíticas; cocos Gram-positivos e catalase-negativos (Biggs, 2009).

Este microrganismo é bastante resistente a baixas temperaturas e, para além de ser encontrado nas camas, também tem sido isolado no solo, boca, vulva, tetos, pele do abdómen e fezes das vacas (Tyler & Cullor, 2008).

Algumas vacas estão permanentemente colonizadas com *Streptococcus uberis* e eliminam um grande número de microrganismos pelas fezes, o que pode estar associado à grande quantidade existente nas camas de palha onde este tipo de mastites existe (Radostits *et al.*, 2000).

O número de microrganismos existentes nas camas varia muito com o tipo de material orgânico usado, sendo muito menor nas camas de serradura do que nas camas de palha. O facto das maternidades usarem na sua maioria camas de palha pode ser um factor de risco para as mastites no início da lactação (Radostits *et al.*, 2000).

Hoje em dia *Streptococcus uberis* é o agente mais comum de infecções intra-mamárias que ocorrem no período seco, verificando-se os casos clínicos no início da lactação (Radostits *et al.*, 2000). No entanto, este agente pode causar mastites clínicas ou subclínicas com aumento na CCS (Pullinger *et al.*, 2006).

As mastites causadas por *Streptococcus uberis* dão origem a quartos quentes, duros e inchados. O animal pode apresentar temperatura elevada durante 24 horas, mas sem sinais tão graves de doença como no caso de mastites por coliformes (Blowey, 1999).

Segundo Radostits *et al.* (2000), alguns serótipos de *Streptococcus uberis* são capazes de resistir à fagocitose dos neutrófilos.

A capacidade de uma estirpe de *Streptococcus uberis* catabolizar proteínas, como a caseína, para libertar aminoácidos para a sua nutrição, permite uma grande vantagem na sua sobrevivência, de tal forma que se multiplica exponencialmente e é mais dificilmente eliminado apenas com a ordenha (Biggs, 2009).

Quando várias vacas de uma vacaria são infectadas por diferentes estirpes significa que a infecção tem um carácter ambiental, enquanto nas vacarias onde só é encontrada uma estirpe de *Streptococcus uberis* significa que este tem um carácter contagioso (Zadock & Schukken, 2003). As estirpes ambientais afectam sobretudo as vacas no período seco ou novilhas, enquanto as estirpes contagiosas afectam sobretudo as vacas em lactação (Biggs, 2009).

Os factores de virulência utilizados por esta espécie de *Streptococcus* incluem as proteínas de matriz extracelular e uma nova proteína designada de SUAM (*Streptococcus uberis adhesion molecule*) que permite a ligação do mesmo à lactoferrina (proteína existente no leite) (Oliver, Luther, Park & Almeida, 2004; Santos *et al.*, 2007). A existência de cápsula não está relacionada com a patogenicidade da estirpe (Pullinger *et al.*, 2006).

A maioria dos casos responde bem à antibioterapia com penicilina, no entanto tem havido um aumento recente de casos crónicos, em que o tratamento é ineficaz (Biggs, 2009).

A implementação de pré-dipping, pós-dipping, tratamento de vacas secas e tratamento ou refugio de vacas infectadas é normalmente eficaz no controlo de mastites contagiosas e previne surtos das mesmas (Zadoks & Schukken, 2003).

3.6.12. *Salmonella*

Existem várias espécies de *Salmonella* que já foram isoladas da glândula mamária das vacas, as quais incluem *S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Muenster*, *S. Enteritidis* e *S. Dublin* (Tyler & Cullor, 2008).

As mastites causadas por *Salmonella* são normalmente crónicas ou subclínicas, surgindo raramente casos clínicos. Os casos crónicos são bastante semelhantes aos casos crónicos de mastites por coliformes (Tyler & Cullor, 2008).

3.6.13. *Arcanobacterium pyogenes*

Arcanobacterium pyogenes pode causar esporadicamente mastites purulentas ou pode ser isolado no caso das mastites de Verão (Radostits *et al.*, 2000).

Este tipo de agente é mais frequente em vacas secas ou novilhas, antes ou na altura do parto. Só ocasionalmente ocorre em vacas em lactação (Lévesque, 2004).

O crescimento laboratorial é lento e as colónias bastante pequenas, tornando-se visíveis apenas após 48 horas, havendo uma zona marcada de hemólise (Biggs, 2009).

Arcanobacterium pyogenes causa mastites clínicas severas caracterizadas por uma secreção espessa, purulenta e com mau cheiro (Lévesque, 2004) e com sinais clínicos de toxémia, como aumento de temperatura, aumento da frequência cardíaca, anorexia, depressão e

fraqueza. Os quartos mais afectados são os anteriores e frequentemente não infecta mais que um (Radostits *et al.*, 2000).

Normalmente as fontes de infecção são as seringas ou cânulas usadas no tratamento intra-mamário, água, infecções de feridas, feridas nos tetos, infecções do úbere, abscessos e tracto genital. As moscas são também uma causa importante de transmissão de *Arcanobacterium pyogenes*, essencialmente em climas húmidos, onde é um risco ter as vacas secas ou novilhas em pastagem (Lévesque, 2004). Este facto justifica a designação porque são conhecidas – mastites de Verão.

Estas mastites podem resultar na perda do quarto afectado ou no refugo precoce do animal (Lévesque, 2004), uma vez que a infecção causa danos irreversíveis na glândula mamária (Radostits *et al.*, 2000).

3.6.14. *Bacillus* spp.

Os *Bacillus* são um género de bastonetes, Gram-positivos que podem ser aeróbios estritos ou facultativos (Biggs, 2009).

Estes agentes contaminam o ambiente e são encontrados no solo, água, pó, ar, fezes, vegetação, feridas e abscessos. *Bacillus*, quando as condições são adversas, produzem endosporos que têm a capacidade de ficar em dormência durante longos períodos (Biggs, 2009).

Normalmente a infecção ocorre devido ao tratamento intra-mamário usando cânulas contaminadas ou fazendo uma incorrecta desinfecção do teto durante o tratamento (Biggs, 2009).

As espécies mais importantes são *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Blowey, 1999), sendo pouco frequentes. As mastites clínicas por *Bacillus cereus* causam mastites gangrenosas muito graves, que podem vir a ser fatais (Biggs, 2009). *Bacillus licheniformis* causa mastites moderadas com espessamento crónico do quarto afectado e pode ascender à vagina vindo a provocar endometrite e diminuição da fertilidade (Blowey, 1999).

3.6.15. Leveduras

As leveduras como *Cândida* spp. e *Cryptococcus neoformans* são ubiqüitárias no ambiente das vacas e são considerados agentes oportunistas que invadem o úbere (Biggs, 2009). Na maioria das vezes são isoladas da silagem (Lévesque, 2004).

As colónias de leveduras são pequenas, brancas e de crescimento lento, demorando 48 horas a desenvolver-se (Biggs, 2009).

A maioria das explorações apresenta casos esporádicos de mastites por leveduras. No entanto, a inserção repetida de cânulas para tratamentos intra-mamários pode danificar a defesa natural do canal do teto, o que facilita a invasão por leveduras (Biggs, 2009).

Quando o tratamento com antibiótico falha, poderá suspeitar que se trata de mastite por leveduras, uma vez que os antibióticos não são eficientes contra estes agentes (Biggs, 2009).

Quando identificadas atempadamente o prognóstico é razoável, devendo fazer-se uma análise passados 7 a 10 dias para garantir a eliminação do agente. No entanto, quando a infecção se torna crónica há alterações na estrutura do úbere que fazem com que o prognóstico seja bastante reservado (Biggs, 2009).

Apesar de não existir nenhum tratamento autorizado para mastites por leveduras, alguns autores têm usado soluções de iodo diluído, duas a três vezes por dia, com bastante sucesso (Biggs, 2009; Blowey, 1999). Também o uso de miconazol tem demonstrado ser eficiente em alguns casos (Radostits *et al.*, 2000). De qualquer maneira, é frequente ocorrer a cura espontânea em 2 a 6 semanas na maioria das vacas infectadas com leveduras, desde que se interrompa o tratamento antimicrobiano e que os quartos afectados sejam ordenhados 4 ou mais vezes durante o dia (George *et al.*, 2008).

3.6.16. *Prototheca*

Prototheca é uma alga ubiquitária, normalmente saprófita, mas que pode ser considerada um agente oportunista que provoca mastites. Este microrganismo vive no solo, na água e outras áreas contaminadas com fezes (Almeraya, 1994), uma vez que necessita de ambientes húmidos e com matéria orgânica para se desenvolver (Scaccabarozzi, Turchetti, Pisoni, Buzzini & Moroni, 2007).

As mastites por *Prototheca* podem ocorrer de forma esporádica ou na forma de surto de rebanho, sendo no entanto, normalmente, de apresentação crónica (Yamamura *et al.*, 2007), podendo afectar as vacas em qualquer fase de lactação (Scaccabarozzi *et al.*, 2007).

A *Prototheca* pertence ao grupo de microrganismos unicelulares não pigmentados, com crescimento de 48 horas em placas agar sangue e com colónias de 1-3mm, de consistência friável e cor acinzentada (Almeraya, 1994).

A espécie mais frequentemente isolada nas infecções intra-mamárias é a *Prototheca zopfii*, que tem um carácter zoonótico (Yamamura *et al.*, 2007). No entanto, num estudo realizado por Marques, Silva, Kraft, Huss e Thompson (2008) foi também isolada *Prototheca blaschkeae*.

Normalmente provoca mastites clínicas que não reagem ao tratamento, mas também podem ocorrer casos de infecções subclínicas com elevadas CCS persistentes (Lévesque, 2004).

Nas mastites por este agente, a glândula mamária diminui de tamanho e a sua consistência à palpação aumenta sem, no entanto, apresentar sinais marcados de inflamação. Há uma diminuição marcada na produção de leite e normalmente as vacas já foram submetidas a antibioterapia intra-mamária sem resultados efectivos (Almeraya, 1994).

Microscopicamente, *Prototheca* é altamente invasiva, o que provoca uma inflamação do tipo granulomatosa, que se reflecte numa acentuada redução da produção de leite (Frank, Ferguson, Cross & Redman, 1969 citado por Almeraya, 1994).

A cura é difícil e não existe nenhum tratamento disponível no mercado. No entanto, Biggs (2009) tem usado iodo com algum sucesso.

Na maioria das vezes é aconselhável refugar os animais afectados de modo a que não haja contaminação do ambiente e transmissão para outras vacas, apesar de alguns produtores apenas secarem os quartos mamários infectados (Yamamura, 2007).

3.6.17. *Leptospira hardjo*

As mastites por *Leptospira hardjo* causam um aumento da temperatura, falta de apetite e o pouco leite que é produzido é muito espesso, parecendo colostro. Um dos sinais mais importantes é a queda súbita e massiva na produção de leite em todos os quartos (Blowey, 1999).

3.6.18. *Nocardia* spp.

Nocardia spp. raramente causa mastites, mas quando ocorrem normalmente são de carácter agudo ou sub-agudo, causando lesões granulomatosas extensas na glândula mamária (Radostits *et al.*, 2000).

Ocasionalmente ocorrem mastites crónicas causadas por *N. brasiliensis* e *N. farcinicus* (Radostits *et al.*, 2000).

Estes microrganismos encontram-se no solo (Lévesque, 2004) e podem sobreviver num dip ineficaz, servindo este de meio de transmissão (Radostits *et al.*, 2000).

As mastites por este agente levam a uma extensa destruição dos tecidos, diminuição da produção e, ocasionalmente, pode mesmo levar à morte do animal. Os quartos afectados apresentam fibrose e o leite apresenta-se viscoso, cinzento e com “farrapos” brancos. (Radostits *et al.*, 2000).

O tratamento normalmente é ineficaz, pelo que a maioria das vacas acabam por ser refugadas (Radostits *et al.*, 2000).

3.6.19. *Yersinia pseudotuberculosis*

Yersinia pseudotuberculosis pertence à família das Enterobacteriaceae e é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, que cresce a temperaturas entre os 4 e os 43°C, tolera valores de pH entre 5 e 9,6 e altas concentrações de sal. Estas características fazem com que tenha uma boa capacidade de sobreviver no ambiente (Wanger, 1998 citado por Shwimmer *et al.*, 2007).

As mastites por *Yersinia pseudotuberculosis* são raras, mas vacarias com más condições de higiene ambiental podem ter episódios recorrentes de mastites por este agente (Shwimmer *et al.*, 2007).

Alguns estudos indicam que esta bactéria tem uma capacidade limitada de infectar a glândula mamária dos bovinos e quando ocorre mastite esta pode ser auto-limitante (Shwimmer *et al.*, 2007).

3.6.20. *Enterococcus* spp.

Enterococcus pertencem à flora gastrointestinal normal das vacas, mas podem ser agentes ambientais oportunistas que causam mastites (Metzger, 2008).

As três espécies mais isoladas são *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. casseliflavus*. No entanto, no estudo realizado por Metzger (2008), *E. faecium* foi o agente mais isolado na glândula mamária e no material das camas. Para além destas espécies, também já foi isolado *E. gallinarium* do úbere das vacas (Hillerton & Berry, 2003).

Muitas espécies são resistentes a vários agentes antimicrobianos (Metzger, 2008), pelo que se torna essencial manter uma boa higiene nas vacarias, de modo a controlar o aparecimento de mastites por este agente.

3.6.21. *Streptococcus* spp.

Do género *Streptococcus*, para além das espécies mais frequentes como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae* já foram isoladas outras espécies, no leite de bovinos. *Streptococcus gallolyticus*, microrganismo com capacidade de descarboxilar o ácido gálico, já foi identificado em amostras de mastite bovina (Devriese *et al.*, 1999 e Segura & Gottschak, 2004 citados por Santos *et al.*, 2007). Para além desse, também *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Streptococcus porcinus*, *Streptococcus saccharolyticus*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus pluranimalium* e *Streptococcus iniae* já foram isolados em alguns casos de mastites clínicas e subclínicas (Santos *et al.*, 2007; Watts, 1988), apesar de terem pouca importância como agentes causadores de mastite bovina.

3.7. Diagnóstico

O acompanhamento do desempenho da saúde do úbere é impossível sem o uso de métodos de diagnóstico fiáveis e acessíveis. Assim, existe uma necessidade constante para aperfeiçoamento desses métodos, quer em termos de precisão, preço de custo ou conveniência (Lam, Olde, Sampimon & Smith, 2009).

O diagnóstico precoce de mastites clínicas é extremamente importante. Primeiro, porque as vacas infectadas devem ser ordenhadas em último lugar ou então com tetinas diferentes, de modo a diminuir o risco de contágio. Por outro lado, um tratamento precoce aumenta a probabilidade de cura e também diminui o risco de transmissão da infecção a outros animais. Por último, o leite dos animais infectados deve ser rejeitado, para não contaminar todo o tanque com bactérias, o que poderá trazer um grande prejuízo para os produtores (Blowey, 1999).

O diagnóstico de mastites começa com observação visual, sendo o papel do ordenhador indiscutivelmente muito importante, nesta fase (Lam *et al.*, 2009). A inspecção visual e a palpação do úbere não requerem mais tempo na ordenha, sendo apenas necessário ter atenção para detectar sinais de inflamação do úbere, como inchaço, calor, dor e rubor do quarto (Lévesque, 2004).

A palpação do úbere vazio pode ser muito útil na detecção de abscessos provocados por *Staphylococcus aureus*, assim como a presença de tecido cicatricial é indicativa de uma lesão permanente da glândula mamária (Lévesque, 2004).

A melhor maneira de detectar mastites nos casos de ausência de sinais físicos de inflamação do úbere é rejeitando os primeiros jactos para um copo de fundo preto. No entanto, esta tarefa é considerada muito morosa por alguns ordenhadores. A rejeição dos primeiros jactos para o chão durante a fase de limpeza dos tetos pode ser uma alternativa útil, embora desta forma a detecção de mastites não seja tão fácil (Blowey, 1999).

A rejeição dos primeiros jactos permite a detecção fácil de coágulos no leite, os quais aparecem no início das mastites clínicas (Lévesque, 2004).

3.7.1. Contagem de células somáticas (CCS)

A CCS é um indicador importante de infecções intra-mamárias desde há vários anos (Schukken, Wilson, Welcome, Tikofsky & Gonzalez, 2003).

Existe evidência experimental de que a CCS acima de 100.000 células/ml tem um impacto negativo na qualidade do leite, reflectindo-se na elaboração de alguns produtos seus derivados

(Saeman, Verdi, Galton & Barbano, 1988). No entanto, apenas se torna um bom indicador de mastite, quando os valores se encontram acima das 200.000 células/ml (Ruegg, 2003).

Um dos testes mais fáceis, rápidos e baratos para estimar a CCS é o Teste Californiano de Mastites (TCM) (Lam *et al.*, 2009). Este é um teste semi-quantitativo que estima o número de CS através da adição de um detergente, o qual lisa a parede celular e nuclear, libertando ADN (Lévesque, 2004). O reagente utilizado é o teepol juntamente com o bromocresol púrpura, que também é usado como indicador do pH. A leitura deve ser efectuada 15 segundos após a agitação, uma vez que a reacção desaparece passado pouco tempo (Ruegg, 2003).

A relação entre a CCS e o TCM não é muito precisa, mas permite fazer uma correspondência aproximada (Ruegg, 2003), como se mostra na tabela abaixo (tabela 3).

Tabela 3 – Interpretação e leitura do TCM

Resultado TCM	Reacção visível	CCS (células/ml)
Negativo	A mistura mantém-se líquida, sem evidência de precipitação	0 – 200.000
Vestígio	Precipitado ligeiro que desaparece com o movimento contínuo	200.000 – 500.000
1	Formação de precipitado, mas nenhuma tendência à formação de gel	400.000 – 1.500.000
2	A mistura engrossa imediatamente e move-se em direcção do centro	800.000 – 5.000.000
3	Formação de gel e a superfície torna-se convexa	> 5.000.000

Adaptado de Ruegg (2003)

Segundo Teixeira *et al.* (2008), deve-se realizar periodicamente (quinzenalmente ou mensalmente) o TCM a todas a vacas e registar os resultados, de modo a poder controlar a situação da exploração.

A medição directa da CCS é logicamente o teste mais fidedigno para nos dar o valor exacto, embora seja mais dispendioso para o produtor e, por isso, nem sempre seja usado. A maioria dos laboratórios utiliza o Fossomatic, um aparelho que utiliza a tecnologia de citometria de fluxo (Lam *et al.*, 2009).

A interpretação dos valores da CCS é, em alguns casos, difícil, uma vez que este parâmetro é influenciado por vários factores, tais como idade, frequência da ordenha, intervalo entre ordenhas, variações diurnas, variações sazonais, fase da lactação, parto, stress e fracção da amostra de leite usada (Lam *et al.*, 2009; Biggs, 2009). No entanto, o factor mais importante que influencia a CCS é a existência de infecção intra-mamária (Lam *et al.*, 2009). Normalmente as CCS elevadas estão associadas à presença de agentes patogénicos “maiores”,

enquanto os agentes “menores” causam apenas um ligeiro aumento (Scaramelli, Ferraro & Troya, 1999). De qualquer forma, uma CCS elevada pode ser ainda um indício de um processo inflamatório de origem não infecciosa (Freitas *et al.*, 2005).

Pode efectuar-se a CCS individualmente do leite de cada teto, a cada animal ou ao leite do tanque. Apesar de o leite individual ser o que permite a identificação do animal doente, o leite do tanque pode ser utilizado mais rotineiramente, de forma a dar uma ideia do que se passa na exploração. Este leite permite, normalmente, apenas identificar a presença de mastites subclínicas numa vacaria e torna-se bastante complicado para o produtor reconhecer problemas de mastites quando os valores da CCS no tanque aumentam devagar ou esporadicamente (Ruegg, 2003). Segundo Radostits *et al.* (2000) pode estimar-se a prevalência de quartos infectados tendo em conta a CCS no leite do tanque, como se demonstra na tabela 4.

Tabela 4 – Estimativa da percentagem de quartos infectados com base na CCS no leite do tanque

CCS no leite do tanque	Percentagem de quartos infectados numa vacaria
200.000	6%
500.000	16%
1.000.000	32%
1.500.000	48%

Adaptado de Radostits *et al.* (2000)

É importante apenas referir, que num estudo realizado por Pantoja e Ruegg (2007), demonstrou-se não haver relação entre a CCS no período seco e a presença de microrganismos no leite na altura do parto.

3.7.2. Culturas bacteriológicas

As culturas bacteriológicas são normalmente usadas como diagnóstico para resolver problemas de mastites, uma vez que o conhecimento do agente causador da infecção pode ser muito útil na prevenção da transmissão destas infecções (Lam *et al.*, 2009).

De qualquer maneira, num estudo elaborado por Lam *et al.* (2009) observou-se que aproximadamente 40% das infecções intra-mamárias nunca chegaram a expressar sinais clínicos, dependendo essencialmente do agente causador de mastite, como mostra a tabela abaixo.

Tabela 5 – Número de infecções intra-mamárias com sinais clínicos em 7 vacarias durante 20 meses

	Nº de infecções intra-mamárias	Nº de infecções intra-mamárias com sinais clínico	% de infecções intra-mamárias com sinais clínicos
<i>E. coli</i>	105	99	94%
<i>Staph. aureus</i>	171	62	36%
<i>Strep. dysgalactiae</i>	80	52	65%
<i>Strep. uberis</i>	79	49	62%

Adaptado de Lam *et al.* (2009)

Apesar disso, este método pode ser recomendado quando se compra uma vaca, antes do tratamento de uma mastite clínica, quando existem mastites subclínicas, rotineiramente nas vacas recém-paridas e para resolver problemas particulares numa vacaria (Lévesque, 2004).

É importante não esquecer que o leite do tanque pode estar contaminado com agentes patogénicos ambientais que surgem de uma má higiene na ordenha, o que resulta na contaminação do tanque com pele, camas, esterco ou água contendo estes microrganismos. Os agentes infecciosos provêm normalmente de infecções intra-mamárias; no entanto, a diluição que se verifica, as infecções latentes, a excreção intermitente e a recolha de apenas uma amostra faz com que a cultura feita em leite de tanque tenha uma sensibilidade baixa (Lam *et al.*, 2009).

É importante ter em atenção que podem surgir culturas falsas positivas e culturas falsas negativas. As falsas positivas ocorrem essencialmente quando há contaminação do leite por uma má higiene da ordenha. As falsas negativas podem ocorrer devido a um mau acondicionamento da amostra, à presença de leucócitos e/ou os antibióticos no leite que podem destruir ou inibir o crescimento dos agentes patogénicos e, alguns microrganismos, como *Mycoplasma*, requerem meios especiais de cultura, enquanto outros, como é o caso de *E. coli*, podem já não se encontrar no leite quando é colhida a amostra (Lévesque, 2004). Como raramente co-existem mais de três microrganismos na mesma infecção, quando são isolados mais de três agentes está convencionado que a amostra é considerada contaminada (Biggs, 2009).

Ao longo de vários anos, têm sido testados vários métodos para aumentar a taxa de identificação de microrganismos patogénicos, entre os quais estão incluídos a incubação de uma pré-cultura, congelamento da pré-cultura, aumento dos volumes de inoculação de uma placa e PCR (Lam *et al.*, 2009).

3.7.3. Teste de condutividade eléctrica

O teste de condutividade eléctrica é outro teste indirecto para detectar mastites (Lévesque, 2004). A condutividade eléctrica no leite é determinada pela concentração de aniões e catiões, como o Na^+ , o K^+ e o Cl^- . Durante uma mastite, a concentração de K^+ diminui no leite e a concentração de Na^+ e Cl^- aumentam, o que faz com que aumente a condutividade eléctrica (Ruegg, 2003). Contudo há que ter em atenção que a condutividade é influenciada pela temperatura do leite, fase de lactação, conteúdo em gordura, intervalo entre ordenhas e raça (Lévesque, 2004).

3.7.4. N-acetil-b-D-glucosaminidas (NAgase)

A NAgase é uma enzima lisossomal que se encontra aumentada no leite quando existe mastite (Radostits *et al.*, 2000). Esta enzima provém do aumento da CCS no leite e é produzida pelos leucócitos e pelas células epiteliais. Apesar de ser uma prova bastante fiável, não se encontra muito difundida a nível das explorações leiteiras (Teixeira *et al.*, 2008).

3.7.5. Detecção de anticorpos no leite

Este método consiste numa prova de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) que detecta anticorpos no leite. Esta técnica tem sido particularmente desenvolvida para identificar mastites por *Staphylococcus aureus*. No entanto, podem ocorrer falsos positivos, uma vez que os anticorpos permanecem durante algum tempo após a resolução da mastite (Teixeira *et al.*, 2008).

3.7.6. Técnicas moleculares

O uso de métodos moleculares para detecção do agente patogénico tem vindo a aumentar na última década, e tem permitido um melhor conhecimento da epidemiologia e patofisiologia das infecções intra-mamárias (Schukken *et al.*, 2004).

A PCR tem sido de longe a técnica mais utilizada, essencialmente, para fazer a diferenciação de espécies, uma vez que muitas vezes as espécies têm diferentes factores de virulência, epidemiologia e taxa de cura (Lam *et al.*, 2009).

Alguns métodos moleculares, como o PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*), ribotipagem, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e MLST (*Multi Locus Sequence Typing*) são usados para fazer a genotipagem do agente (Lam *et al.*, 2009), permitindo determinar estirpes e clones.

Existem ainda alguns métodos automáticos de detecção de mastites que têm em conta alterações na condutividade eléctrica do leite ou que têm filtros montados ao longo do tubo. A desvantagem destes dois métodos é que quando se detecta a mastite, já o leite entrou para o tanque e o contaminou. Para além disso, também não são capazes de detectar mastites em que o leite se encontra aguado e sem coágulos, o que é o caso de algumas mastites por *E. coli* (Blowey, 1999).

3.8. Tratamento

O tratamento instituído em doenças infecciosas, como é o caso das mastites, deve servir para ajudar o sistema imunitário a eliminar o agente patogénico e/ou reduzir as consequências fisiopatológicas da infecção (Erskine *et al.*, 2003).

Actualmente, apenas está recomendado o uso de antibioterapia no tratamento de mastites contagiosas, não sendo aconselhável nas ambientais (Teixeira *et al.*, 2008), salvo raras excepções. Nas infecções intramamárias agudas é aconselhável o uso de analgésicos com acção anti-inflamatória e anti-tóxica, bem como de pomadas tópicas mamárias de uso dérmico que diminuam a inflamação, devendo a ordenha ser completa e auxiliada pela ocitocina. (Teixeira *et al.*, 2008). No entanto, nos casos em que há toxémia é necessário recorrer à antibioterapia, ao uso de fluidoterapia endovenosa com soluções salinas hipertónicas de modo a restabelecer o equilíbrio hídrico, e a fármacos com actividade anti-endotóxica, de modo a neutralizar rapidamente a acção das toxinas (Teixeira *et al.*, 2008).

3.8.1. Antibioterapia

A escolha do antibiótico deve ser feita sempre pelo veterinário, que terá em conta qual o tipo de problema que se encontra na vacaria (Blowey, 1999) e deve visar a eficácia terapêutica e os benefícios económicos, tanto do ponto de vista da recuperação da produção de leite, como na eliminação de fontes de infecção (Costa, 2006).

Segundo Costa (2006), o antibiótico ideal seria aquele que fosse capaz de controlar todos os processos infecciosos do úbere e não deixasse resíduos no leite. Como tal não existe, para a escolha do antibiótico deve-se ter em consideração vários factores como: o espectro de acção do antimicrobiano, a sua capacidade em alcançar e manter a concentração terapêutica efectiva no local de infecção (leite, glândula mamária e sangue), ter um tempo apropriado de tratamento, não provocar efeitos adversos locais ou sistémicos e que não mantenha resíduos durante muito tempo (Constable & Morin, 2003).

Como na maioria das vezes, os resultados de cultura não chegam em tempo oportuno para a escolha dos antimicrobianos, o seu uso pode ser limitado às mastites por bactérias Gram-positivas, consoante as características da infecção (Roberson, 2003).

De um modo geral, os antibióticos devem actuar inicialmente ao nível do tecido mamário e só posteriormente serem absorvidos para a circulação (Teixeira *et al.*, 2008).

Os antibióticos mais eficazes e mais indicados para o tratamento de mastites são: penicilina, cloxacilina, ampicilina, penetamato de penicilina, gentamicina, nafcilina, cefazolina, cefoperazona e cefquinoma (Teixeira *et al.*, 2008).

Os *Streptococcus* são geralmente sensíveis à penicilina. Algumas estirpes de *Staphylococcus* que produzem penicilases não são sensíveis à penicilina, pelo que se deve usar penicilinas sintéticas (ex: cloxacilina), combinações de antibióticos (ex: amoxicilina e ácido-clavulânico) ou antibióticos resistentes às penicilases (ex: eritromicina e novobiocina). *E.coli*, *Pseudomonas* e *Klebsiella* são totalmente resistentes à penicilina, daí que, para combatê-las, se privilegie o uso de tetraciclina, cefalosporinas, amoxicilinas (Blowey, 1999) e quinolonas (Costa, 2006). Segundo Blowey (1999) é importante cada exploração ter apenas um, ou no máximo dois, protocolos de rotina.

Vantagens e desvantagens da antibioterapia em casos de mastites:

- Vantagens: aumento das hipóteses de sucesso no tratamento, particularmente nas infecções por Gram positivos; redução da excreção bacteriana no leite, o que reduz o contágio na vacaria e o aumento na CCS no leite do tanque, bem como os seus impactos económicos; resolução mais rápida dos sinais clínicos e, por isso mesmo, retorno mais rápido na produção de leite; melhoria da qualidade de gordura em relação à lactose e caseína; e redução da possibilidade de recidivas (Biggs, 2009).

- Desvantagens: custos do tratamento e perda de tempo por parte do ordenhador; custos das descargas presentes no leite, o que pode ser particularmente relevante nas vacas de alta produção; risco de contaminação no leite do tanque; teoricamente, risco de aumento das resistências aos antibióticos; ausência de métodos de controlo por parte dos produtores que passam a achar que o antibiótico resolve todos os problemas; e possibilidade de não afectar significativamente infecções especialmente por Gram negativos (Biggs, 2009).

Existem vários factores que afectam a acção dos antibióticos, entre os quais se encontram a facilidade com que o fármaco penetra no úbere, a concentração alcançada no seu interior e a persistência do fármaco no tecido mamário, após a administração (Blowey, 1999).

No tratamento de mastites durante a fase de lactação é desejável que o fármaco tenha uma persistência curta na glândula, de modo a reduzir a presença de resíduos no leite após o tratamento. Por isso, recomenda-se o uso de um antimicrobiano em veículo aquoso, que

permite uma maior difusão no leite. Os tratamentos realizados durante a lactação, sob o ponto de vista custo-benefício, não devem ultrapassar os 5 dias, uma vez que é no intervalo de 3 a 5 dias que ocorrem os maiores índices de cura clínica (Costa, 2006). Para além disso, o prolongamento ou a aplicação de vários tratamentos sucessivos com diferentes antimicrobianos pode levar ao aparecimento de infecções por leveduras ou fungos, que são de mais difícil combate (Teixeira *et al.*, 2008).

No tratamento de vacas no período seco pretende-se que o fármaco tenha uma longa persistência na glândula mamária, pelo que se associa óleo mineral com monoestearato de alumínio a 3% (Costa, 2006).

A administração de antimicrobianos por via intramamária deve ter em consideração algumas características consoante a fase de lactação em que se encontra a vaca. Nas vacas em lactação, o fármaco deve ser pouco irritante, ter uma baixa concentração mínima inibitória (CMI), ter um baixo grau de ligação às proteínas, um baixo grau de ionização no úbere, uma libertação rápida e uma baixa persistência. Nas vacas no período seco, este deve ter uma acção bactericida, não ser irritante, ter alto grau de ligação às proteínas e ser estável (Costa, 2006). Uma das grandes vantagens do uso de antibioterapia intramamária é a alta concentração que se pode verificar no leite quando se utiliza esta via. Por exemplo, segundo Pyörälä (2009), a concentração de penicilina G no leite é 100-1.000 vezes maior após a administração intramamária do que depois da administração parentérica. A introdução das bisnagas para a terapêutica intramamária deve ser feita com bastante cuidado higiénico, de modo a que não haja introdução de bactérias, leveduras ou fungos na glândula mamária. As cânulas utilizadas devem ser curtas, de modo a que penetrem só até ao esfíncter externo para reduzir o risco de entrada de agentes patogénicos (Radostits *et al.*, 2000).

Os antimicrobianos com boa difusão quando aplicados por via intramamária são: o penetamato, a ampicilina, a amoxicilina, o novobiocina, a eritromicina e a tilosina. Os agentes com difusão moderada são a penicilina G, a cloxacilina e a tetraciclina. Por outro lado, a estreptomicina e a neomicina apresentam muito pouca difusão na glândula mamária (Costa, 2006).

Muitas vezes, o tratamento com antibióticos locais é coadjuvado com antibióticos parentéricos. Isto ocorre particularmente nos casos de surtos de mastites (Teixeira *et al.*, 2008). O tratamento sistémico deve ser utilizado sempre que há mastites clínicas com sinais sistémicos. O que permite evitar que ocorra bacteriémia e septicémia (Radostits *et al.*, 2000), verificando-se mais rapidamente a normalização da temperatura e da produção de leite (Cuteri *et al.*, 2008). Os antimicrobianos usados por esta via devem atingir facilmente as concentrações óptimas na glândula mamária, sem afectar outros sistemas, como o sistema

gastro-intestinal. Para isso, estes fármacos devem ter uma alta lipossolubilidade, baixa percentagem de ligação às proteínas plasmáticas e serem uma base fraca quando se considera o pH ligeiramente ácido do leite normal. Em condições normais, apenas os macrólidos (eritromicina e tilosina), as tetraciclina, o trimetoprim e as fluorquinolonas apresentam boa distribuição na glândula mamária (Costa, 2006).

Penicilinas: As penicilinas não se distribuem bem na glândula mamária, embora atinjam concentrações maiores quando esta se encontra inflamada, excepto nas áreas necróticas. A concentração bactericida mínima pode ser obtida com administração parenteral. Quando se usa a via intramamária, recomenda-se uma dose de 11.000 UI/Kg a cada 12 horas. Nas vacas secas, a penicilina deve ter um veículo de monoestearato de alumínio, na dose de 100.000-200.000 UI por quarto. O uso de penicilina com novobiocina apresenta excelentes resultados em alguns casos de mastite. Das penicilinas sintéticas, a cloxacilina tem sido cada vez mais utilizada, sendo recomendada a dose de 500 mg no período seco. A ampicilina, por sua vez, apresenta alta difusão na glândula mamária, sendo a dose recomendada de 10 a 20 mg/Kg por via parentérica e 60 a 65 mg/quarto por via intramamária, aplicada 2 vezes ao dia, durante 3 a 5 dias. A ampicilina intramamária pode ser associada a uma penicilina por via parentérica, apresentando uma eficiência de 50% em mastites por *Staphylococcus* e por *Streptococcus* e 40% nas mastites por *Arcanobacterium pyogenes* (Costa, 2006). *Streptococcus uberis* tem demonstrado ser bastante sensível às penicilinas e, apesar de existirem muitos microrganismos resistentes à penicilina G, a sensibilidade dos *Streptococcus* não tem sofrido muitas alterações nos últimos 40 anos (Hillerton & Berry, 2003). A amoxicilina tem demonstrado ser bastante eficaz no tratamento de mastites por *Streptococcus agalactiae*, por SCN e por *Streptococcus* spp. (Wilson *et al.*, 1999). Segundo Pyörälä (2009) o penetamato, por ser mais lipofílico que a penicilina G, apresenta uma melhor difusão no leite.

Cefalosporinas: As cefalosporinas de 1ª geração, como a cefoperazona e o cefalonio têm uma boa a excelente actividade contra bactérias Gram-positivas, mas pouca actividade contra as Gram-negativas, enquanto os fármacos de 3ª geração têm uma boa a moderada actividade contra bactérias Gram-positivas, e uma boa a excelente actividade contra as Gram-negativas (Moroni *et al.*, 2006). A cefoperazona, na dose de 250 mg/quarto, tem apresentado uma eficácia de cerca de 80% nos principais agentes de mastites. Este fármaco não é irritante e persiste no úbere, em concentrações adequadas, durante 48 horas após a administração por via intramamária. A associação de cefoxazol e penicilina tem apresentado bons resultados, assim como a cefapiridina (dose 500 mg/quarto), o cefacetil e a cefquinona (uma cefalosporina de 4ª geração) (Costa, 2006). Num estudo realizado por Roy, DesCoteaux, DuTremblay e Beaudry (2008), a cefapirina demonstrou ser eficaz no tratamento de vacas infectadas por

Staphylococcus aureus. A cefquinona tem uma óptima distribuição nos tecidos e uma baixa CMI para as bactérias Gram-negativas, assim como o ceftiofur (cefalosporina de 3ª geração) tem uma excelente actividade contra agentes Gram-negativos (Erskine *et al.*, 2003). Num estudo realizado por Hallberg (2006), a administração de 500 mg de ceftiofur por via intramamária na última ordenha da lactação, foi eficaz na eliminação de infecções intramamárias presentes durante a lactação e na prevenção de novas infecções.

Tetraciclinas: Estes fármacos atingem uma boa concentração na glândula mamária quando administrados por via parental. A oxitetraciclina é recomendada como primeira escolha no tratamento de mastites por *Mannheimia haemolytica* e *Aerobacter aerogenes*. As tetraciclinas de longa acção, na dose de 20 mg/Kg, são capazes de manter a concentração óptima durante 72 horas, com um IS de 96 horas. Devido ao seu IS longo, não é recomendado o seu uso durante a lactação. A doxiciclina tem sido indicada como bastante eficiente nas mastites por *Nocardia* spp. e *Chlamydia*. *Mycoplasma* spp., apesar de apresentar sensibilidade à doxaciiclina *in vitro*, na prática esta não se tem apresentado muito eficaz *in vivo* (Costa, 2006).

Macrólidos e lincosaminas: Estes dois grupos de fármacos apresentam um comportamento farmacocinético semelhante. Estes antibióticos têm uma concentração óptima, equivalente a 3 a 5 vezes à concentração do plasma, ultrapassando por isso os valores de CMI para a maioria dos microrganismos Gram-positivos, alguns anaeróbios e *Nocardia asteroides*. A eritromicina pode ser aplicada por via parentérica ou intramamária. No entanto, quando o pH da glândula mamária aumenta, poderá ser diminuído o aporte por via parenteral. A tilosina tem-se demonstrado efectiva no combate de *Mycoplasma* spp., e quando associada à tetraciclina é usada no tratamento de *Pasteurella* spp. Os valores de CMI da tilosina são relativamente baixos para *Streptococcus* beta-hemolíticos, *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium* spp., apresentando bons resultados na prática. A pirlimicina tem sido recomendada nas mastites causadas por Gram-positivas e no combate aos microrganismos que resistem à fagocitose, como é o caso de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (Costa, 2006), sendo capaz de manter a concentração efectiva apenas com a administração de uma dose por dia, mesmo que se efectue a ordenha 3 vezes por dia (Erskine *et al.*, 2003).

Polimixinas: Os derivados da polimixina B e colistina podem ser úteis no tratamento de mastites por Gram-negativos, como *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Pasteurella* spp. e *Proteus* spp. Estes fármacos são considerados de excelência no tratamento de mastites por *E. coli*, não só porque têm uma grande actividade contra este microrganismo, como também porque diminuem os efeitos sistémicos da endotoxina. A dose recomendada é de 7 mg/Kg por via parenteral e de 200 mg/quarto por via intramamária (Costa, 2006).

Aminoglicosídeos: A estreptomicina, a neomicina e a gentamicina têm sido usados isoladamente ou associados a outros antibióticos no tratamento de mastites. Estes fármacos apenas são utilizados por via intramamária; no entanto, o leite reduz a actividade dos aminoglicosídeos, especialmente da neomicina (Costa, 2006). Para além disso, os aminoglicosídeos apresentam um intervalo de segurança grande, pelo que não devem ser uma escolha frequente (Pyörälä, 2009).

Sulfonamidas: As sulfonamidas têm um bom espectro de actividade contra os principais agentes patogénicos de mastites, principalmente quando associadas ao trimetoprim (Costa, 2006).

Quinolonas: As fluoroquinolonas são as quinolonas mais frequentemente utilizadas nas mastites, sendo usadas nos casos de mastites clínicas durante a lactação ou subclínicas, durante o período de seca (Costa, 2006). São também úteis nas mastites por coliformes, quando administrados por via parenteral.

A tabela 6 apresenta de uma forma sucinta os antibióticos mais específicos para cada agente e a via de administração mais apropriada.

Tabela 6 – Agentes antimicrobianos e via de administração mais apropriada para cada agente

Agente	Antimicrobianos	Via de administração
<i>Streptococcus</i> spp.	Penicilina G, cloxacilina, ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas	Intramamária
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Amoxicilina, penicilina G, cloxacilina, cefalosporina	Intramamária
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Penicilina G, cloxacilina e cefalosporinas	Intramamária
<i>Staphylococcus aureus</i>	Penicilina G, cefalosporinas, cloxacilina, pirlimicina	Intramamária e parenteral
SCN	Penicilina G, amoxicilina, cefalosporinas, pirlimicina	Intramamária
<i>Streptococcus uberis</i>	Penicilina G, ampicilina, cloxacilina	Intramamária e parenteral
Coliformes	Sulfonamidas, aminoglicosídeos, amoxicilina, tetraciclina, cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, polimixina B, quinolonas	Parenteral
<i>Mycoplasma bovis</i>	Tilosina, quinolonas	Parenteral
<i>Corynebacterium</i> spp.	Penicilinas	Intramamária

Adaptado de Constable *et al.* (2008) e George *et al.* (2008)

SCN – *Staphylococcus coagulase negativo*

Uma fraca resposta à antibioterapia pode ocorrer por vários motivos. Uma das principais causas é a presença de pús e detritos que bloqueiam os ductos e alvéolos, o que faz com que o antibiótico seja incapaz de penetrar no local da infecção, situação esta que é frequente nas mastites por *Staphylococcus aureus*, mas que também pode ocorrer nas infecções por *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae*. Existem ainda algumas estirpes de *Staphylococcus* e *Streptococcus uberis* que conseguem sobreviver no interior de células, o que os protege contra a acção dos antibióticos (Blowey, 1999). Outros factores que interferem na eficácia de um tratamento são as alterações anatomopatológicas que ocorrem em algumas mastites, como é o caso das provocadas por *Arcanobacterium pyogenes*, cuja reacção tecidual é tão intensa que pode dificultar o acesso do antimicrobiano ao foco de infecção (Costa, 2006). Para além disso, alguns agentes patogénicos como *Mycoplasma*, *Prototheca*, *Nocardia*, *Pseudomonas* e leveduras não respondem ou respondem pouco a um tratamento com antibióticos (Morin, 2004).

Para o tratamento de *Streptococcus agalactiae* está recomendado fazer-se um protocolo terapêutico radical, denominado por “Blitz”. Este protocolo consiste no tratamento de todo o efectivo, através de antibioterapia intramamária em todos os quartos durante 4 a 5 ordenhas consecutivas, preferencialmente com penicilina. O impacto económico que este procedimento provoca, devido à não comercialização de leite durante cerca de uma semana (devido ao IS dos fármacos utilizados), faz com que o produtor seja normalmente muito reticente a esta opção (Teixeira *et al.*, 2008).

No caso de *Staphylococcus aureus*, torna-se essencial caracterizar o isolado em relação à sua sensibilidade às penicilinas, de modo a que só se implemente um protocolo terapêutico nos casos em que a taxa de cura é alta, refugando-se as outras vacas (Barkema, Schukken & Zadoks, 2006).

3.8.2. Tratamento no período seco

A probabilidade de ocorrerem novas infecções intramamárias durante os primeiros 21 dias do período seco é 6 vezes maior do que a verificada durante a lactação (Hallberg *et al.*, 2006); por isso, é essencial ter cuidados extras durante esta fase.

Historicamente, o tratamento durante o período seco envolvia a eliminação de agente patogénico através de uma grande variedade de medicamentos tópicos e de massagem do úbere para activar a circulação (Biggs, 2009).

O tratamento durante este período apresenta várias vantagens: promove a eliminação de infecções presentes no úbere no final da lactação (eficácia entre 70 a 90%) e reduz a incidência de novas infecções, em cerca de 50 a 75%, particularmente no que diz respeito a

Streptococcus ambientais (Lévesque, 2004); permite que não haja desperdício de leite; a resposta é muito mais eficaz, uma vez que as doses de antibióticos administradas são normalmente maiores, porque não há a preocupação da presença de resíduos no leite; podem utilizar-se antibióticos com um tempo de actuação muito maior; permite aumentar a protecção contra “mastites de Verão” e reduz a incidência de mastites clínicas na altura do parto (Biggs, 2009).

O uso de tratamento a todas as vacas e a todos os quartos tem sido aconselhado por vários autores, uma vez que existem sempre vacas que funcionam como reservatório de agentes infecciosos, sem que apresentem sinais clínicos (Blowey, 1999; Lévesque, 2004). No entanto, alguns autores consideram que se deve tratar apenas as vacas infectadas. Por um lado, reduzem-se os custos em tratamentos; por outro lado a eliminação dos agentes considerados “menores” pode tornar a vaca mais susceptível aos agentes ambientais e, por fim, previne-se a possível emergência de novas resistências bacterianas (Pyörälä, 2002; Radostits *et al.*, 2000).

Nas vacas com mastites por SCN, o tratamento no período seco consegue eliminar entre 80% a 100% das infecções, enquanto apenas 73% podem curar espontaneamente (Sears & McCarthy, 2003).

Um dos agentes em que se tem verificado um grande sucesso no tratamento durante o período seco é o *Staphylococcus aureus*, para além de que também previne o aparecimento de novas infecções. Nestes casos, o protocolo terapêutico deve ser efectuado durante 6 a 8 dias, de modo a que se mantenham níveis terapêuticos de antibiótico (Sears & McCarthy, 2003). Num estudo realizado por Zafalon, Filho, Oliveira e Resende (2007), obteve-se uma taxa de cura de cerca de 80% no tratamento durante o período seco de vacas com *Staphylococcus aureus*. De qualquer forma, este é considerado o agente mais difícil de eliminar, particularmente quando as infecções já são crónicas (Lévesque, 2004).

Deve evitar-se fazer o tratamento de secagem durante as duas últimas semanas antes do parto, devido ao risco de provocar a contaminação do leite com antibióticos (Teixeira *et al.*, 2008).

É importante ainda referir que a resposta dos animais ao tratamento de mastites durante o início do período seco decresce com a idade (Teixeira *et al.*, 2008).

3.8.3. Tratamento em novilhas

As mastites em novilhas têm vindo a ser reconhecidas como um problema. Um estudo efectuado por Borm *et al.* (2006), em várias regiões da América do Norte, demonstrou que 63% das novilhas e 34% dos seus quartos tinham infecções intramamárias no primeiro parto. Uma vez que é durante a primeira lactação que ocorre um maior desenvolvimento do tecido da glândula mamária (Davidson & Staberfeldt, 2007), uma infecção na altura do parto pode

ter efeitos adversos no futuro da glândula mamária (Nickerson, Owens & Boddie, 1995). O uso de antibioterapia intramamária em novilhas antes do parto tem sido sugerido como uma estratégia para redução das mastites ao parto. No entanto, como é considerada uma tarefa complicada e nada prática, a administração de tilosina parentericamente demonstrou ter algum efeito na redução de infecções intramamárias nesta altura. De qualquer modo, o mais importante é o maneio e a higiene a que as novilhas estão sujeitas (Contreras & Sears, 2008). Segundo Erskine *et al.* (2003), as infusões intramamárias com antibióticos beta-lactâmicos, 7 a 14 dias antes da data prevista do parto, reduzem a taxa de mastites nestes animais após o parto, enquanto Nickerson *et al.* (1995) consideram que a antibioterapia intramamária realizada mais de 45 dias antes do parto é a que apresenta maior redução do número de mastites ao parto. Por sua vez, Radostits *et al.* (2000) referem que o tratamento de novilhas com cefapirina, 10 a 12 semanas antes do parto, elimina 90% das infecções intramamárias de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e coliformes. As vantagens de tratamento durante esta fase são semelhantes às vantagens do tratamento efectuado durante o período seco (Nickerson *et al.*, 1995).

3.8.4. Tratamento de suporte:

- **Remoção do leite:** a remoção regular do leite infectado do quarto permite a recuperação mais rápida, uma vez que se vai eliminando parte dos agentes microbianos encontrados na glândula mamária (Biggs, 2009), assim como os metabolitos produzidos na decorrência do processo inflamatório e os seus mediadores de inflamação (Costa, 2006). Num estudo realizado por Almeida, Brito, Brito, Pires e Benites (2005), o uso de ordenhas múltiplas foi capaz de eliminar a infecção por *Staphylococcus aureus* em metade dos animais infectados. No entanto, como este estudo foi realizado a uma amostra pequena de animais, é aconselhável o acompanhamento clínico dos animais sujeitos a esta terapêutica. A remoção do leite também é fundamental nas mastites por coliformes (Biggs, 2009).

- **Massagem com unguentos ou pomadas tópicas:** o uso de massagem local permite que haja uma chamada de sangue ao local e encoraja os processos de defesa natural, o que poderá ainda ser mais facilitado com a ajuda das pomadas. A sua capacidade irritante provoca a dilatação dos capilares superficiais e aumenta o fluxo de sangue para a pele do úbere (Biggs, 2009). Segundo Lévesque (2004), o encharcamento do úbere com água fria ou a aplicação de compressas frias ou gelo pode dar algum conforto à vaca com o úbere inflamado; no entanto, o gelo nunca deve ser aplicado directamente sobre a pele do úbere nem durante mais de 20 minutos.

- **Ocitocina:** a ocitocina é frequentemente usada como uma ajuda para a remoção do leite infectado do quarto. Nas mastites muito severas, em que o úbere se encontra muito doloroso devido ao bloqueio dos alvéolos e ductos pelo leite, o uso de ocitocina apenas poderia exacerbar esse efeito nas células mioepiteliais. No entanto, o uso de altas doses de ocitocina tem demonstrado que alarga as junções entre as células secretoras, o que permite a passagem de mediadores inflamatórios do sangue para o lúmen da glândula mamária, onde se encontra a maioria das bactérias (Biggs, 2009).

- **Fluidoterapia:** nas mastites agudas, as vacas podem apresentar-se com sinais bastante graves, desenvolvendo choque tóxico, que muitas vezes é acompanhado de diarreia. Nestes casos, os animais apresentam-se desidratados e torna-se fundamental recorrer à fluidoterapia para repor o equilíbrio hidro-electrolítico. Podem ser utilizados soros isotónicos ou hipertónicos (Biggs, 2009). O mais frequente é o uso de 1 a 3 litros de soro salino hipertónico EV para encorajar a vaca a beber água (Lévesque, 2004).

- **Corticosteróides:** podem ser utilizados nos estádios iniciais de inflamação, mas não têm grandes efeitos quando a inflamação já está instalada (Biggs, 2009). Os corticosteróides têm algumas propriedades anti-inflamatórias, mas podem ter um impacto negativo no sistema imunitário, particularmente com usos prolongados, pelo que pode ser contraproducente em infecções, para além de poderem provocar o aborto em vacas gestantes (Costa, 2006). Alguns antibióticos de administração intramamária contêm corticosteróides, com o objectivo de reduzirem o efeito irritante do antibiótico ou servirem de anti-inflamatório (Biggs, 2009).

- **Anti-inflamatórios não esteróides (AINEs):** são fármacos com grandes capacidades anti-inflamatórias, anti-endotóxicas e anti-piréticas e, por isso, são utilizados nos casos em que os animais se encontram com sinais clínicos. Os AINEs têm ainda propriedades analgésicas, que são muitas vezes subestimadas (Biggs, 2009). Para além da sua grande importância na redução dos efeitos da endotoxina nos casos de mastites por *E. coli* ou outros coliformes, ainda favorece a acção de alguns agentes antimicrobianos. Normalmente, o mais utilizado é a flunixinina meglumina, na dose de 1,1 mg/Kg, via intramuscular (IM) ou endovenosa (EV). O cetoprofeno (dose de 2 mg/dia por via IM) também tem demonstrado ser útil no tratamento de mastites agudas (Costa, 2006).

- **Cálcio:** sabe-se que algumas vacas com mastites tóxicas apresentam hipocalcémia; no entanto, tem sido difícil determinar a sua causa e qual a associação entre mastites e hipocalcémias (Biggs, 2009).

- **Enzimas:** as enzimas como a estreptoquinase estreptodornase, a tripsina e a papaína têm sido usadas no tratamento de mastites para facilitar a difusão do antibiótico, de modo a que

seja ultrapassada a reacção tecidual, o que normalmente dificulta que se atinjam as concentrações terapêuticas no foco de infecção (Costa, 2006).

- **Métodos alternativos:** Num estudo realizado no Brasil, a bioterapia (tratamento realizado com medicamentos preparados a partir de excreções, secreções, tecidos e órgãos de animais e vegetais) demonstrou ser eficiente na cura de mastites subclínicas, verificando-se uma redução significativa nas reacções ao TCM e no número de colónias isoladas após o tratamento (Almeida *et al.*, 1999). Também o uso de algumas plantas com propriedades antimicrobianas tem vindo a ser cada vez mais estudado, no sentido de se poder confirmar a sua actividade no combate a mastites (Avancini, Wiest, Dall'Agnol, Haas & Poser, 2008).

O tratamento com prata também tem sido objecto de estudo, verificando-se uma significativa redução do edema e da dureza do úbere, da presença de coágulos no leite, bem como da CCS e do número de bactérias no leite, quando administrada por via intramamária (Kang, Hur, Jung, Do & Kim, 2008).

3.9. Resistências aos agentes antimicrobianos

Sempre que possível, o tratamento com agentes antimicrobianos deve ser seleccionado tendo em conta os resultados dos antibiogramas, que consistem em testes que determinam a sensibilidade dos agentes microbianos aos diferentes antibióticos. Este é um aspecto essencial, uma vez que o problema das resistências tem vindo a acentuar-se cada vez mais, devido ao uso indiscriminado e inadequado dos antibióticos (Costa, 2006).

O problema das resistências aos antibióticos, para além de ter um grande impacto no tratamento de infecções em animais, pode trazer graves consequências para a saúde humana, uma vez que a ineficácia dos antimicrobianos leva a um aumento da morbilidade e da mortalidade em algumas doenças infecciosas (White, Cray & Chiller, 2006). Os animais de produção podem servir como um reservatório de bactérias resistentes que mais tarde podem vir a afectar o ser humano (Gentilini *et al.*, 2002). Por este motivo, têm sido desenvolvidos sistemas de monitorização de resistências a antimicrobianos em alguns países, como o NARMS (*National Antimicrobial Resistance Monitoring System*) nos EUA (White *et al.*, 2006).

As resistências antimicrobianas podem ser naturais (como é o caso de *Staphylococcus aureus* às penicilinas) ou adquiridas (Costa, 2006). Normalmente as resistências adquiridas desenvolvem-se por meio de mutações cromossómicas, embora também os plasmídeos a possam transmitir, pois podem conter genes de resistência e têm a capacidade de se mover

entre bactérias, podendo assim disseminar a resistência entre agentes. (Makovec & Ruegg, 2003).

Os mecanismos de resistência aos fármacos beta-lactâmicos incluem a produção de beta-lactamases e produção de proteínas que têm uma baixa afinidade de ligação às penicilinas, designadas PBP2a (Gentilini *et al.*, 2002).

Existem seis métodos que permitem determinar a susceptibilidade dos agentes microbianos a determinados antibióticos: diluição em caldo, diluição em leite, diluição em agar, determinação da concentração mínima bactericida (CMB), determinação da cinética de morte e método de difusão em disco. Os primeiros cinco métodos são quantitativos, enquanto a difusão em disco é um método qualitativo (Constable & Morin, 2003). O método mais frequentemente utilizado é o da difusão em disco, devido ao seu baixo custo e rapidez. No entanto, este método apresenta algumas limitações (Erskine *et al.*, 2003), uma vez que se trata de um método qualitativo (os resultados são apresentados em: sensível, intermédio e resistente) e mudanças subtis na susceptibilidade podem não ser aparentes (Makovec & Ruegg, 2003).

Sabe-se que alguns microrganismos resistentes a determinadas concentrações de antibióticos tornam-se sensíveis quando se aumenta a concentração da dose, normalmente duas a cinco vezes a CMI. No entanto, deve-se ter em atenção o risco de aparecimento de efeitos tóxicos (Costa, 2006) e o aumento do IS.

Devido ao largo espectro das tetraciclínas e aminoglicosídeos, estes têm sido usados frequentemente para tratar doenças respiratórias e outras doenças dos bovinos, pelo que se tem vindo a verificar um aumento das resistências a estes fármacos (Moroni *et al.*, 2006)

Segundo Erskine *et al.* (2003), *Streptococcus* demonstraram ser susceptíveis à penicilina, ampicilina e cefalosporinas, enquanto *Staphylococcus aureus* é muitas vezes resistente a antibióticos que podem ser inactivados pelas β -lactamases. Por sua vez, os microrganismos Gram-negativos são naturalmente resistentes a vários agentes antimicrobianos, excepto às quinolonas, aos aminoglicosídeos, às sulfamidas e às cefalosporinas.

Os coliformes são resistentes aos macrólidos em geral, à pirlimicina e à penicilina (Morin, 2004).

Tem-se também verificado uma grande resistência de *Streptococcus uberis* à cloxacilina (Hillerton & Berry, 2003) e, enquanto nuns países, a resistência de *Staphylococcus aureus* às penicilinas têm aumentado, noutros tem vindo a diminuir (Barkema *et al.*, 2006). De acordo com um estudo realizado por Leemput e Zadoks (2006) *Streptococcus uberis* apresentam 21% de resistência à eritromicina.

Segundo Costa (2006), os agentes microbianos isolados nos casos de mastites têm apresentado poucas resistências às cefalosporinas.

A maioria dos SCN são resistentes às sulfamidas-trimetoprim, ampicilina e eritromicina (Sears & McCarthy, 2003).

Num estudo realizado por Corrêa, Corrêa e Marin (2005), várias espécies de *Staphylococcus* coagulase positivo apresentaram mais frequentemente resistência às sulfonamidas, ampicilinas, penicilinas e lincomicinas. Para além disso, praticamente todos os isolados apresentaram resistência a dois ou mais antimicrobianos.

As enterobacteriaceas do género *Serratia* são resistentes aos derivados da polimixina B e colistina (Costa, 2006).

Num estudo realizado em várias regiões de São Paulo e Minas Gerais no Brasil, verificou-se uma grande resistência às sulfonamidas por parte dos agentes patogénicos (Costa, 2006).

A disponibilidade de novos fármacos de gerações mais recentes, com um maior espectro de acção, surge como uma alternativa fácil, associada a uma maior probabilidade de sucesso terapêutico. No entanto, a adaptação das estirpes microbianas aos novos fármacos ocorre de uma forma muito rápida; por isso, para evitar que se desenvolvam resistências a estes fármacos, estes nunca deverão ser a primeira escolha terapêutica (Nunes, Cavaco, Vilela & Bexiga, 2007).

Para combater o aumento das resistências aos antimicrobianos, a primeira escolha terapêutica deve sempre incluir um antibiótico de largo espectro, como a penicilina G, e só se este não se revelar eficaz é que se deve usar uma cefalosporina de 3ª ou 4ª geração (Pyörälä, 2009).

3.10. Controlo

Um programa de controlo e prevenção de mastites deve ser um processo metódico, criterioso e dinâmico, que seja contínuo no tempo (Teixeira *et al.*, 2008). Um programa eficaz de controlo de mastites deve estar baseado, essencialmente, nas medidas de prevenção (Costa, 2006). Dentro dos pontos-chave, encontra-se a higiene, a máquina de ordenha, a selagem dos tetos, o tratamento de mastites clínicas e o refugo dos animais irrecuperáveis (Teixeira *et al.*, 2008).

Segundo Ruegg (2003,) o objectivo de uma vacaria em relação às mastites subclínicas deve ser o de ter menos de 15% das vacas com CCS superiores a 250.000 células/ml e menos de 5% das vacas a desenvolver novas infecções subclínicas por mês. No caso das mastites

clínicas a avaliação deve ser feita individualmente, mas um objectivo razoável deve ser o de ter uma incidência de menos de 2% das vacas por mês.

Segundo o NIRD (*National Institute for Research in Dairying*), o programa de controlo de mastites deve ser desenvolvido tendo em conta 10 pontos (Radostits *et al.*, 2000):

- 1 – métodos adequados de higiene do úbere e gestão da ordenha;
- 2 – correcta instalação, funcionamento e manutenção do equipamento da ordenha;
- 3 – gestão e tratamento das vacas secas;
- 4 – tratamento adequado de mastites durante a lactação;
- 5 – abate das vacas com infecções crónicas;
- 6 – manutenção de um ambiente adequado;
- 7 – manutenção de bons registos;
- 8 – monitorização do estado de saúde do úbere;
- 9 – revisão periódica da gestão da saúde do úbere;
- 10 – estabelecimento de metas para o estado de saúde do úbere.

De acordo com Teixeira *et al.* (2008), um programa de controlo deve ter por base:

- 1 – redução da duração da infecção
 - . tratamento de todos os quartos de todas as vacas com mastites subclínicas imediatamente antes do período seco;
 - . tratamento dos casos clínicos quando ocorrem;
 - . refugo das vacas com infecções crónicas.
- 2 – redução da taxa de disseminação dos microrganismos
 - . imersão dos tetos em solução desinfectante antes e após a ordenha (dipping);
 - . verificação do correcto funcionamento da máquina de ordenha;
 - . ordenha das vacas infectadas no fim da ordenha;
 - . maneo correcto e boa higiene na exploração.

Segundo Radostits *et al.* (2000), recomenda-se o maneo adequado na ordenha; instalação correcta, manutenção e funcionamento periódico dos equipamentos de ordenha; higienização de equipamentos e úbere da vaca; bom maneo do período seco; boa nutrição e alimentação das vacas imediatamente após a ordenha para que se mantenham de pé; ordenha das vacas infectadas no fim; terapia apropriada durante a lactação; refugo dos animais com infecção crónica; manutenção de um ambiente apropriado para a produção de leite; manutenção de um bom sistema de registo; monitorização do estado da saúde do úbere; revisões periódicas do programa de maneo e saúde do úbere.

Aproximadamente 20% a 30% das infecções da glândula mamária são eliminadas espontaneamente pelo sistema imunitário do animal. Deste modo, torna-se essencial tomar

boas medidas de manejo, alimentação adequada e ausência de stress para reduzir o número de infecções (Tozzetti, Bataier, Almeida & Piccinin, 2008), maximizando os mecanismos de defesa natural dos tetos e do úbere (Blowey, 1999).

De um modo geral, os programas de controlo de *Staphylococcus aureus* devem ter por base a segregação, higiene eficiente, procedimentos adequados de gestão da exploração e protocolos terapêuticos racionais (Zecconi, 2006).

Outro procedimento que tem demonstrado ser de extrema importância no período seco é a selagem dos tetos, após a última ordenha e após a administração dos antibióticos intramamários. Esta selagem dos tetos é normalmente realizada através da administração do selante que fecha o canal do teto à entrada de novos agentes. Este método é particularmente eficaz durante as primeiras três semanas após a instilação, o que coincide com o período mais susceptível a novas infecções (Teixeira *et al.*, 2008), reduzindo a incidência de novas infecções durante o período seco e reduzindo a CCS e os casos de mastites clínicas na lactação subsequente (Leslie, 2004; Seegers, Billon, Roussel, Serieys & Bareille, 2008). Uma vez que este método não elimina nenhuma infecção, só deve ser utilizado nos animais que comprovadamente não estão infectados (Hillerton & Berry, 2005).

Ao longo dos últimos anos, têm vindo a ser desenvolvidas várias vacinas contra os agentes responsáveis por mastites, mas esta questão tem-se revelado problemática. Um dos problemas é o elevado número de agentes patogénicos e a sua heterogeneidade e outro é o facto de as imunoglobulinas em circulação só entrarem no úbere depois de se desenvolver uma mastite (Pyörälä, 2002).

Contudo, na ausência de um programa de controlo de mastites e na presença de grandes resistências aos agentes antimicrobianos, a vacinação contra alguns dos agentes patogénicos parece ser a melhor escolha para reduzir as perdas causadas pelas mastites (Yousaf, Muhammad, Rahman, Siddique & Masood, 2009).

O papel das vacinas é estimular a produção de anticorpos para controlarem alguns agentes patogénicos. Infelizmente, não existem vacinas que possam ser usadas contra todos os microrganismos causadores de mastites (Lévesque, 2004).

As vacinas contra os coliformes não reduzem o número de infecções, mas reduzem a severidade dos sinais clínicos. Por isso, segundo Lévesque (2004), o uso de vacinas contra coliformes é economicamente compensador quando a incidência de mastites por este agente é superior a 2%.

A maioria das vacinas contra *Staphylococcus* foram direccionadas para a redução de novas infecções intramamárias em novilhas, através do uso de bacterinas associadas ou não a toxóide, de modo a dar uma boa protecção cruzada. Tanto os adjuvantes como as toxinas

contribuem para melhorar a resposta imunitária e reduzir a severidade das infecções (Sears & McCarthy, 2003), verificando-se efectivamente uma diminuição na prevalência e incidência de mastites por *Staphylococcus aureus* (Yousaf *et al.*, 2009). No entanto, nas vacarias com grandes problemas com *Staphylococcus* spp., o uso de vacinas de rebanho pode ser recomendado (Haynes, 2001).

A consciencialização por parte dos produtores dos prejuízos causados pelas mastites e a adopção de medidas de controlo e prevenção, de modo criterioso e persistente, fará com que as infecções da glândula mamária tenham um impacto menor nas explorações de leite (Müller, 2002).

4. Estudo de caso

4.1. Objectivos

As mastites constituem uma das principais causas de perdas económicas nas explorações de bovinos de leite, pelo que a sua prevenção deve constituir uma prioridade para produtores e veterinários (Ruegg, 2003).

Por questões de saúde pública, sobretudo as relacionadas com a presença de resíduos e a disseminação de resistências bacterianas aos antibióticos, a OMS (Organização Mundial de Saúde) recomendou, em 2001, a redução e o uso racional de antibióticos em bovinos leiteiros (Bexiga, Cavaco & Vilela, 2005). Neste sentido, a identificação dos agentes etiológicos e a avaliação do seu perfil de sensibilidade a fármacos antimicrobianos torna-se essencial para a selecção adequada da antibioterapia a instituir (Gentilini *et al.*, 2002).

Dada a diversidade das práticas clínicas e de manejo a nível internacional, a extrapolação para a realidade portuguesa dos resultados de estudos internacionais sobre este tema, pode não contribuir para a minimização deste problema. Deste modo, torna-se essencial o conhecimento dos principais agentes etiológicos de mastites em Portugal e do seu perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

O presente trabalho visa a caracterização da população microbiana responsável por mastites subclínicas e clínicas em três explorações de bovinos leiteiros da zona de Montemor-o-Velho. Também se pretendeu avaliar o perfil de susceptibilidade dos agentes de mastite, obtidos nessas explorações, face aos fármacos disponíveis no mercado nacional para terapêutica de mastites.

Os objectivos deste estudo de caso são os seguintes:

- Calcular a percentagem de isolados dos agentes microbianos no total de três explorações;
- Verificar a distribuição dos agentes por número e dia de lactação;
- Analisar a relação entre a presença de agentes e o número e dia de lactação;
- Relacionar os tipos de agentes com o resultado do TCM;
- Avaliar a resistência de alguns agentes causadores de mastites a determinados antimicrobianos.

4.2. Material e métodos

Animais

O estudo foi realizado em 982 amostras de leite, provenientes de animais de três explorações da região de Montemor-o-Velho. Os dados utilizados dizem respeito ao período entre Maio de 2008 e Fevereiro de 2010. Em duas explorações foram realizadas as provas de estábulo no ano de 2008 e 2009, onde 268 animais apresentavam os dados relativos ao dia da lactação e número da lactação e 410 amostras tinham referência ao resultado do TCM efectuado ao leite proveniente das quatro glândulas. Não sabendo como foi realizada a recolha do leite.

No que se refere ao estudo das resistências dos agentes de mastites aos antimicrobianos, tivemos acesso a 102 antibiogramas, realizados através do método oficial de difusão em disco (método de Kirby-Bauer), referentes ao mesmo intervalo de tempo, tendo sido utilizados apenas 81 antibiogramas que se referem aos agentes que apresentavam mais do que 5 antibiogramas.

As provas de estábulo foram realizadas por pessoal da Segalab (Laboratório de Sanidade Animal e Segurança Alimentar, S.A.) e a identificação dos agentes e os antibiogramas foram realizados sempre pelo mesmo laboratório. No caso dos antibiogramas, as amostras de leite foram recolhidas, de forma asséptica, pelos próprios proprietários e enviadas para o laboratório em refrigeração.

Explorações

Duas das explorações têm cubículos, utilizando uma delas serradura como material de cama (exploração 1) e a outra, areia (exploração 2). A mudança das camas é realizada de uma forma regular, estando sempre em boas condições de higiene, bem como as vacas que se apresentam sempre limpas. Na terceira exploração, as vacas têm acesso a um parque coberto e a um aberto. O parque coberto tem algumas zonas com palha como material de camas e a zona exterior apenas tem terra. Todas as explorações apresentam boas condições de higiene, boa ventilação, o sistema de alimentação utilizado é através de dieta completa (Total Mixed Ration) e têm dimensão média (média de 100 vacas em ordenha). A raça predominante em todas elas é a Holstein Frisian, sendo frequente a compra de novilhas de substituição, vindas de França, Dinamarca ou outras explorações portuguesas.

A ordenha é mecânica em todas as explorações e realizada pelas proprietárias, com auxílio de familiares ou pessoal da sua confiança. Em todas elas, as pessoas que se encontram a ordenhar usam luvas e bata no momento da ordenha, bem como um pano seco individual, por vaca, para limpeza dos tetos. Numa das explorações, utiliza-se pré e pós-dipping (exploração 3),

enquanto nas outras apenas pós-dipping. Todas as explorações fazem tratamento a todas as vacas no início do período seco, não havendo mudanças de bsnagas de seca de forma regular. Apenas a exploração 2 utiliza selante interno no momento da secagem desde há vários anos. Na exploração 3, é realizado antibiograma a todas as vacas durante essa fase para proceder à escolha adequada do antibiótico a usar.

Na tabela 7 encontram-se sistematizadas as características fundamentais das três explorações.

Tabela 7 – Caracterização das três explorações

	Exploração 1	Exploração 2	Exploração 3
Nº médio de animais em lactação	103	126	99
Parque	Coberto	Coberto	Coberto e aberto
Tipo de cama	Serradura	Areia	Palha/terra
Uso de pré-dipping	Não	Não	Sim
Uso de pós-dipping	Sim	Sim	Sim
Tratamento de secagem	Todos os animais	Todos os animais	Todos os animais de acordo com antibiograma
Uso de selante	Não	Sim	Não
Proveniência das novilhas de substituição	Portugal e Dinamarca	Portugal e França	Portugal e França

Tratamento de dados

O tratamento de dados foi realizado através do software SPSS versão 17.0, nomeadamente o cálculo de estatísticas descritivas, a análise de frequências, as correlações e as regressões lineares. O cálculo das prevalências e outras percentagens foi realizado com o software Microsoft Excel 2003.

4.3. Resultados

Prevalências

Das 982 amostras identificadas, obteve-se um resultado de 284 culturas negativas (28,9%), 26 contaminadas (amostras onde foram isolados mais de três agentes) (2,7%) e 672 amostras com identificação de agentes (68,4%). A Tabela 8 mostra as percentagens dos agentes identificados.

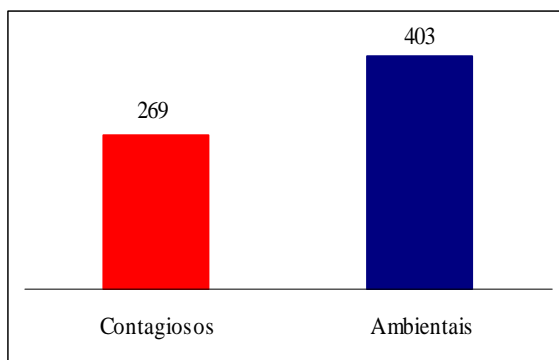
Tabela 8 – Prevalência dos diferentes agentes identificados

Agentes	Nº de casos	% de isolados
Culturas negativas	284	28,9
Contaminação	26	2,7
<i>Corynebacterium</i> spp.	228	23,2
Outros coliformes	114	11,6
SCN	78	7,9
<i>Streptococcus</i> spp.	63	6,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	33	3,4
<i>Staphylococcus</i> spp.	20	2,0
<i>Enterococcus</i> spp.	56	5,7
<i>Lactococcus</i> spp.	18	1,8
<i>Bacillus</i> spp.	14	1,4
<i>Escherichia coli</i>	12	1,2
Leveduras	12	1,2
<i>Streptococcus uberis</i>	11	1,1
<i>Strep. dys. dysgalactiae</i>	8	0,8
<i>Aerococcus viridans</i>	5	0,5

SCN – *Staphylococcus* Coagulase Negativa

Dos agentes identificados, 60% são agentes ambientais e 40% são contagiosos, como se pode observar no gráfico 3.

Gráfico 3 – Número de agentes contagiosos e ambientais



Dos agentes identificados apenas 29,3% são considerados agentes patogénicos “maiores” (coliformes, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* e leveduras), enquanto que 70,7% são agentes “menores”.

Os principais agentes de mastites (*Corynebacterium* spp., coliformes, SCN, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp., leveduras, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*) representam 75,9% dos agentes totais isolados. A tabela 9 mostra a frequência de todos os agentes.

Tabela 9 – Frequência dos agentes isolados

Agentes	Nº de casos	Frequência %
Culturas negativas	284	-
Contaminação	26	-
<i>Corynebacterium</i> spp.	228	33,9
Outros coliformes	114	17,0
SCN	78	11,6
<i>Streptococcus</i> spp.	63	9,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	33	4,9
<i>Staphylococcus</i> spp.	20	3,0
<i>Enterococcus</i> spp.	56	8,3
<i>Lactococcus</i> spp.	18	2,7
<i>Bacillus</i> spp	14	2,1
<i>Escherichia coli</i>	12	1,8
Leveduras	12	1,8
<i>Streptococcus uberis</i>	11	1,6
<i>Strep. dys. dysgalactiae</i>	8	1,2
<i>Aerococcus viridans</i>	5	0,7

SCN – *Staphylococcus* Coagulase Negativa

No que se refere às diferentes explorações não se verificou uma diferença muito significativa entre os principais agentes responsáveis por mastites, excepto na exploração 3 onde se verificou uma percentagem menor de coliformes (tabela 10).

Tabela 10 – Prevalências dos agentes nas diferentes explorações

Agentes	Percentagem de isolados (%)		
	Exploração 1	Exploração 2	Exploração 3
Culturas negativas	33,5	25,8	31,0
<i>Corynebacterium</i> spp.	22,0	24,3	22,2
Outros coliformes	11,5	17,3	2,6
SCN	8,9	5,6	11,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,2	1,6	5,6
<i>Escherichia coli</i>	-	2,3	0,3
<i>Bacillus</i> spp.	0,5	0,8	2,9
Leveduras	0,5	1,0	2,0
<i>Streptococcus uberis</i>	1,0	1,9	-
<i>Strep. dys. dysgalactiae</i>	-	1,0	1,0

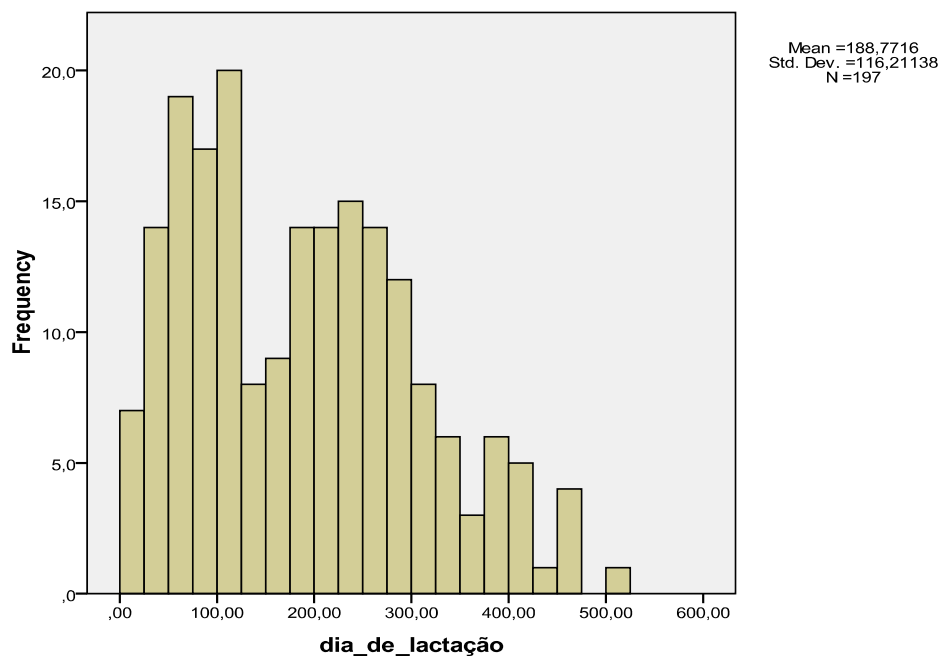
SCN – *Staphylococcus* Coagulase Negativa

Dia e número de lactação

No total de amostras, apenas 268 tinham dados referentes ao dia e número de lactação em que se encontravam os animais no momento da colheita.

No que se refere ao dia de lactação as vacas onde foi isolado *Corynebacterium* spp. encontravam-se em média nos 160 dias de lactação (DP=109), as de coliformes encontravam-se em média nos 211 dias de lactação (DP=112), SCN encontravam em média nos 208 dias de lactação (DP=109), as vacas com *Staphylococcus aureus* apresentavam-se em média nos 262 dias de lactação (DP=150) e com *Streptococcus* spp. encontravam-se em média nos 250 dias de lactação (DP=118). De um modo geral, as vacas onde se verificou presença de agentes encontravam-se em média nos 188 dias de lactação (DP=116) (gráfico 4), enquanto que as que obtiveram culturas negativas encontravam-se em média nos 181 dias de lactação (DP=131). No entanto, de acordo com a correlação de Spearman, não existe evidência estatística de uma relação entre o dia de lactação e o isolamento de agentes infecciosos ($p=0,39$).

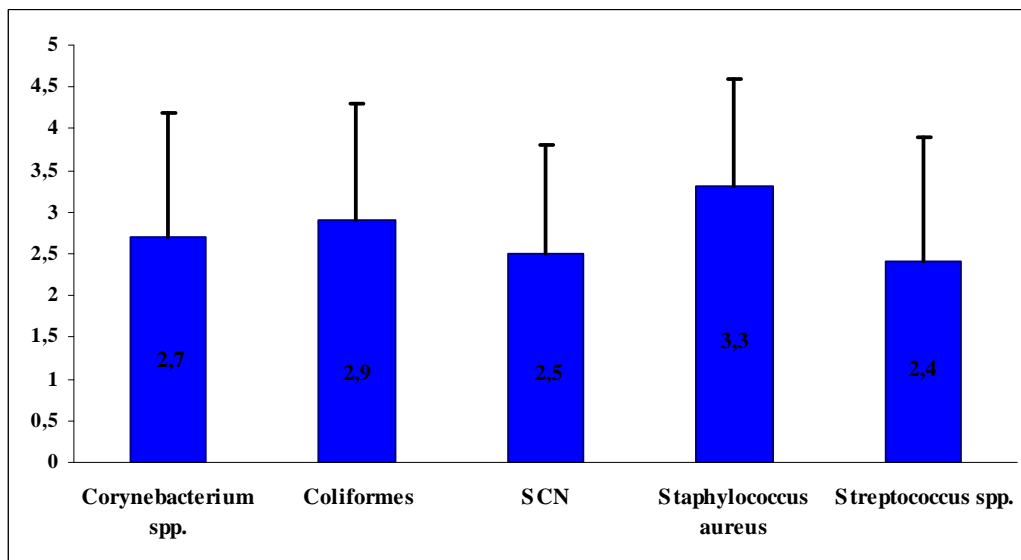
Gráfico 4 – Histograma de dia de lactação na presença de agentes microbianos



Em relação ao número de lactação, as vacas com *Corynebacterium* spp. apresentavam em média nas 2,7 lactações (DP=1,5), com coliformes apresentavam-se em média nas 2,9 lactações (DP=1,4), com SCN encontravam-se em média nas 2,5 lactações (DP=1,3), com *Staphylococcus aureus* apresentavam-se em média nas 3,3 lactações (DP=1,3) e com *Streptococcus* spp. encontravam-se em média nas 2,4 lactações (DP=1,5). Em termos globais, as vacas onde se verificou a presença de agentes apresentou uma média de 2,9 lactações

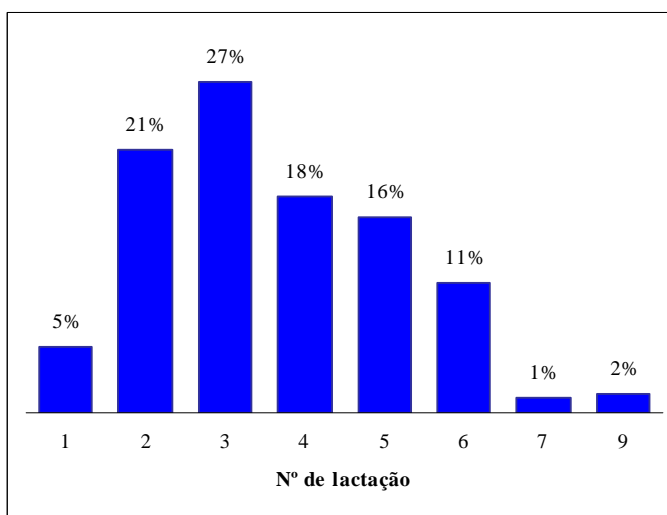
(DP=1,5), enquanto que as vacas com culturas negativas apresentaram uma média de 2,4 lactações (DP=1,4) (gráfico 5).

Gráfico 5 – Média \pm DP de número de lactação em 5 agentes microbianos



Em termos percentuais, 95% dos animais onde houve isolamento do agente encontravam-se para além da 2ª lactação. A maioria dos animais encontrava-se na 3ª lactação (27% dos animais), seguindo-se de animais que se encontravam na 2ª lactação, como se pode observar no gráfico 6.

Gráfico 6 – Percentagem de animais com presença de agentes por número de lactação



Verificou-se ainda que existia uma correlação positiva de 18,8% ($p=0,002$) entre o isolamento de agentes e o número de lactação. De acordo com a regressão linear presente no anexo II, existe evidência estatística para afirmar que a probabilidade de isolamento de agentes de mastite aumenta em média 5% por cada lactação adicional ($p=0,007$).

Testes efectuados no estábulo

Das 982 amostras a que tivemos acesso, 410 apresentavam dados relativos aos resultados de testes efectuados no estábulo aquando da recolha da amostra. Tentando relacionar o resultado de TCM com a presença de determinados agentes (agentes com maiores percentagens de isolados) e com agentes no geral, obtivemos as seguintes percentagens que se encontram na tabela 11.

Tabela 11 – Resultado dos testes efectuados no estábulo por agente isolado

Agente	Resultado de TCM (%)			Quartos		
	0	1	2	M	S	Total
<i>Corynebacterium spp.</i>	41,0	15,0	34,0	6,0	4,0	100
Coliformes	47,9	10,4	20,8	12,5	8,3	100
SCN	48,1	14,8	33,3	3,7	0,0	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,1	27,3	54,5	0,0	9,1	100
<i>Streptococcus spp.</i>	30,0	45,0	20,0	5,0	0,0	100
Presença de agentes	34,2	15,1	35,2	11,3	4,2	100
Culturas negativas	77,0	4,8	8,7	3,2	6,3	100

TCM – Teste Californiano de Mastites, M – quarto com sinais de mastite, S – quarto seco, SCN – *Staphylococcus* Coagulase Negativa.

Resistências

Na determinação das resistências aos antimicrobianos foram utilizados 81 antibiogramas, que correspondem a 6 agentes diferentes. Os agentes analisados foram SCN, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, coliformes de um modo geral, *Enterococcus spp.* e *Streptococcus dysgalactiae dysgalactiae*, uma vez que eram os agentes com mais de 5 antibiogramas. Foram testados 19 agentes antimicrobianos, mais frequentemente utilizados nos casos de mastites: cloxacilina, ampicilina, estreptomicina, cefazolina, penicilina, trimetoprim+sulfadiazina, amoxicilina+ácido clavulânico, pirlimicina, rifaximina, cefalexina+canamicina, cefoperazona, cefalexina, lincomicina, penetamato, cefuroxima, gentamicina, cefalonio e eritromicina.

Para efeitos de análise estatística os agentes testados que apresentaram um perfil de sensibilidade intermédia foram considerados como resistentes.

Dos isolados de SCN analisadas 19% apresentavam resistência à ampicilina e à penicilina e 14,3% à cloxacilina. Dos isolados de *Streptococcus spp.* 72,7% eram resistentes à cloxacilina e 36,4% à estreptomicina. Dos de *Staphylococcus aureus* analisadas 20% eram resistentes à

penicilina e 10% à ampicilina, à amoxicilina+ácido clavulânico e à eritromicina. Dos isolados de coliformes 83,3% eram resistentes à espiramicina, 77,8% à ampicilina e 38,9% à estreptomicina e amoxicilina+ácido clavulânico. Dos de *Enterococcus* spp. isoladas 93,3% eram resistentes à cloxacilina e 53,3% à cefazolina. Dos isolados de *Streptococcus dysgalactiae dysgalactiae* isolados nenhuma apresentou resistências aos 19 antibióticos testados (tabela 12).

Tabela 12 – Resistências aos antimicrobianos

Antimicrobiano	SCN	Streptococcus spp.	Staphylococcus aureus	Coliformes	Enterococcus spp.	Strep. dys. dysgalactiae
	(n=21)	(n=11)	(n=10)	(n=18)	(n=15)	(n=6)
	%	%	%	%	%	%
Cloxacilina	14,3	72,7	0,0	5,6	93,3	0,0
Ampicilina	19,0	0,0	10,0	77,8	40,0	0,0
Estreptomicina	9,5	36,4	0,0	38,9	26,7	0,0
Espiramicina	0,0	9,1	0,0	83,3	13,3	0,0
Cefazolina	0,0	0,0	0,0	27,8	53,3	0,0
Penicilina	19,0	0,0	20,0	5,6	26,7	0,0
Trimetoprim/sulfadiazina	0,0	18,2	0,0	0,0	20,0	0,0
Amox/ac-clav	0,0	0,0	10,0	38,9	0,0	0,0
Pirlimicina	0,0	0,0	0,0	0,0	40,0	0,0
Rifaximina	4,8	18,2	0,0	5,6	6,7	0,0
Cefalexina+canamicina	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0	0,0
Cefoperazona	0,0	0,0	0,0	0,0	26,7	0,0
Cefalexina	0,0	9,1	0,0	5,6	6,7	0,0
Lincomicina/neomicina	0,0	18,2	0,0	0,0	0,0	0,0
Penetamato	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0	0,0
Cefuroxima	0,0	0,0	0,0	0,0	13,3	0,0
Gentamicina	4,8	9,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Cefalonio	0,0	9,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Eritromicina	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0

SCN – *Staphylococcus* Coagulase Negativa, Amox/ac-clav – amoxicilina + ácido clavulânico

Dos agentes antimicrobianos utilizados o antibiótico a que os agentes microbianos apresentaram maiores resistências foi a cloxacilina, seguindo-se a ampicilina, estreptomicina, espiramicina, cefazolina e penicilina. Os que apresentaram uma menor percentagem de resistências foram o cefalonio, a eritromicina, a cefuroxima, a gentamicina e a lincomicina-neomicina.

Em termos médios os β -lactâmicos foram os antibióticos a que os agentes microbianos apresentaram mais resistências, seguindo-se os macrólidos, as cefalosporinas de 1ª geração, os aminoglicosídeos, as lincosamidas, a cefalosporinas de 3ª geração e por fim, a cefalosporina de 2ª geração.

4.4. Discussão

O sector do leite em Portugal tem-se defrontado com grandes adversidades. Por um lado, o aumento generalizado dos custos de produção e, por outro, a dificuldade de comercialização, devido ao comportamento da Grande Distribuição, que tem optado pela importação de leite. Por estas razões, torna-se fundamental tentar maximizar os lucros dos produtores de leite portugueses e, para tal, é fundamental a diminuição do número de mastites, quer clínicas, quer subclínicas.

Neste trabalho, o agente mais frequentemente isolado foi *Corynebacterium* spp., seguindo-se de coliformes e de SCN. Os principais agentes contagiosos, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus agalactiae*, apresentaram uma prevalência bastante baixa (4,9%, 0,8% e 0%, respectivamente) comparando com outros estudos (Riekerink, Barkema, Kelton & Scholl, 2008; Bexiga *et al.*, 2005).

Quanto a *Corynebacterium* spp., a sua prevalência pode ser considerada normal, uma vez que coloniza no canal do teto (Biggs, 2009). No entanto, o isolamento deste agente pode ser indicativo da falta de desinfecção do teto no pós-dipping ou ineficácia do produto usado (Tyler & Cullor, 2008).

O facto de não ter sido isolado *Streptococcus agalactiae* é um indício de que se cumprem todas as boas práticas de ordenha, uma vez que este agente é um parasita obrigatório da glândula mamária e a sua sobrevivência no ambiente é rara. Segundo Zadoks e Fitzpatrick (2009) este agente encontra-se erradicado em vários países da Europa Ocidental que aplicam programas de controlo de mastites, no entanto este resultado não é compatível com o último estudo realizado em Portugal (Bexiga *et al.*, 2005).

Como demonstra a tabela 13, as prevalências e frequências dos agentes isolados neste trabalho são, de um modo geral, mais parecidas com estudos efectuados na Suíça (Brechtbuehl, Stalder, Albini & Kaufmann, 2008), Finlândia (Pitkälä, Haveri, Pyörälä, Myllys & Buzalski, 2004) e Canadá (Riekerink *et al.*, 2008). Apenas a prevalência de coliformes é semelhante ao estudo realizado anteriormente em Portugal (Bexiga *et al.*, 2005). No entanto, é preciso realçar que o estudo realizado por Bexiga *et al.* (2005) é referente apenas a mastites subclínicas, abrange um maior número de animais, as explorações utilizadas são de maiores dimensões e situam-se numa outra região do país, o que pode justificar algumas das diferenças observadas.

Tabela 13 – Prevalências e frequências de agentes patogénicos causadores de mastites em diferentes estudos

	Estudo de caso (2010) Portugal	Riekerink <i>et al.</i> (2008) Canadá	Bexiga <i>et al.</i> (2005) Portugal	Pitkälä <i>et al.</i> (2004) Filândia	Lévesque (2004) NY e Pensilv.	Izak <i>et al.</i> (2007) Arg.	Crupp <i>et al.</i> (2008) Brasil	Albornoz <i>et al.</i> (2008) Uruguai	Brechbuehl <i>et al.</i> (2008) Suíça
<i>Corynebacterium</i> spp.	23,2 ¹ (33,9) ²	0,2 (0,4)	12,4	11,5 (34,4)	7,2	5,0 (15,0)	(2,4)	-	18,9
SCN	7,9 (11,6)	5,1 (10,7)	18,1	16,6 (49,6)	11,3	9,7 (28,9)	(11,3)	2 (3,9)	27,5
<i>Streptococcus</i> spp.	6,4 (9,4)	2,1 (4,4)	7,4	0,07 (0,2)	7,3	-	(4,0)	15 (35,5)	6,0
<i>Staph aureus</i>	3,4 (4,9)	10,3 (21,7)	7,8	3,4 (10,2)	9,1	8,2 (24,5)	(31,8)	22 (52)	1,6
<i>E.coli</i>	1,2 (1,8)	8,4 (17,6)	-	-	0,4	-	(8,8)	-	-
Coliformes	11,6 (17,0)	5,5 (11,5)	7,9	0,1 (0,4)	0,4	3,0 (9,0)	(9,8)	-	0,2
<i>Bacillus</i> spp.	1,4 (2,1)	1,1 (2,2)	17,2	-	-	-	(1,9)	-	0,9
Leveduras	1,2 (1,8)	1,9 (4,0)	-	-	0,1	-	(1,7)	-	-
<i>Streptococcus uberis</i>	1,1 (1,6)	6,3 (13,3)	7,4	0,7 (1,9)	-	4 (11,9)	(1,05)	-	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	0,1 (0,3)	13,9	0,02 (0,07)	10,1	1,6 (4,8)	(16,3)	3 (6,6)	0,2
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	0,8 (1,2)	4,0 (8,4)	2,8	0,05 (0,1)	-	2 (6,0)	(2,8)	-	-
<i>Enterococcus</i> spp.	5,7 (8,3)	2,2 (4,7)	-	0,4 (1,2)	-	-	(0,8)	-	-
<i>Staphylococcus</i> spp.	2,0 (3,0)	0,1 (0,3)	-	-	-	-	-	-	-
Culturas negativas	28,9 (-)	43,9 (-)	23,5 (-)	62,4 (-)	51,5 (-)	66,5 (-)	-	56,7 (-)	44,7 (-)

1 – valores sem parêntesis correspondem à prevalência dos agentes; 2 – valores entre parêntesis correspondem à frequência dos agentes

NY – New York; Pensilv. – Pensilvânia; Arg. – Argentina; SCN – *Staphylococcus* coagulase negativo

No que se refere à diferença entre as três explorações, a exploração 3 é a que apresenta menor prevalência de coliformes, o que pode ser explicado não só pelo uso de pré-dipping, mas também por ser uma exploração em que as vacas têm permanentemente acesso a um parque não coberto, pelo que há menores problemas de ventilação. Por outro lado, o facto das provas de estábulo terem sido realizadas sempre no Verão pode ter influenciado este resultado, uma vez que, segundo Radostits *et al.* (2000), nas vacas que se encontram em pastagem verifica-se uma redução da incidência de mastites por coliformes durante esta estação do ano.

Por estranho que pareça, a exploração 2 é a que apresenta maior prevalência de coliformes, apesar de ser a única que utiliza areia como material de cama e usa selante interno à secagem.

Isto pode querer indicar ou que as vacas se contaminam na altura do parto, quando se encontram na maternidade em que as camas são de palha, ou que algumas colheitas de amostras nesta exploração não foram realizadas com todos os cuidados necessários de higiene, havendo por isso contaminação das mesmas. No que diz respeito aos agentes contagiosos mais importantes (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus dysgalactiae dysgalactiae*), a exploração 2 é a que apresenta uma menor prevalência, o que pode significar que os cuidados de higiene durante a ordenha devem ser feitos com algum rigor.

Nos países mais avançados na produção leiteira, onde os produtores aplicam sistematicamente programas de controlo baseados na higiene e na terapia com antibióticos, tem-se observado uma diminuição da prevalência de microrganismos contagiosos e um aumento relativo dos agentes ambientais (Calvinho & Tirante, 2005).

Em termos globais, observou-se que as três explorações que integraram este trabalho apresentavam uma baixa prevalência de agentes contagiosos, e proporcionalmente um aumento dos agentes ambientais, o que não é compatível com o estudo realizado por Bexiga *et al.* (2005), em Portugal, nem com outros estudos internacionais. Apesar de nas três vacarias em estudo serem aplicados programas de controlo de mastites, não se pode concluir que estes resultados correspondam à realidade das explorações, uma vez que apenas tivemos acesso ao resultado dos isolados das amostras de leite, não sabendo como foi feita a recolha. É possível que os proprietários tenham seleccionado as vacas para as colheitas, tendo deixado de parte as vacas que sabiam que estavam contaminadas ou aquelas que tinham como objectivo refugá-las por problemas na saúde do úbere.

Em termos globais, os resultados obtidos sugerem que os principais agentes contagiosos de mastite estão a ser eficazmente controlados, o que indica que tem havido um desenvolvimento tecnológico e uma melhor formação dos tratadores/proprietários, estando os programas de controlo de mastites a ser aplicados adequadamente. No entanto estes resultados devem ser analisados com algum cuidado, não só pelos argumentos referidos anteriormente, mas também pelo reduzido número de observações.

No que se refere aos dias de lactação, o agente em que as vacas apresentaram uma média de dia de lactação mais baixa foi *Corynebacterium* spp. com 160 dias de lactação, enquanto o *Staphylococcus aureus* foi o agente isolado em que as vacas apresentaram uma média mais elevada (262 dias de lactação). No entanto, uma vez que, de acordo com a correlação de Spearman, não existe evidência estatística de uma relação entre o dia de lactação e o isolamento de agentes antimicrobianos ($p=0,39$), não é possível tirar conclusões.

Staphylococcus aureus foi o agente em que as vacas apresentaram uma maior média no número de lactação (3,3 lactações), apesar de em todos os outros agentes isolados e analisados

as vacas apresentarem uma média superior a 2 lactações. Os resultados obtidos na correlação de Spearman e na regressão linear são compatíveis com estudos anteriores que confirmam que a prevalência de quartos infectados aumenta com a idade (Radostits *et al.*, 2000; Reyes & Mellado, 1994). Neste caso, 27% dos agentes isolados encontravam-se na terceira lactação e 95% encontravam-se acima da segunda lactação.

Coliformes foram os agentes responsáveis por uma maior percentagem de mastites clínicas em comparação com os outros agentes. *Staphylococcus aureus* foram os agentes isolados com maior percentagem de quartos secos, o que pode ser explicado pelo facto de ser um dos agentes mais frequentes relacionados com casos crónicos, sendo frequente os proprietários secarem o quarto infectado de modo a manterem a lactação e poderem continuar a aproveitar o leite dos outros quartos.

Corynebacterium spp. e SCN são os agentes com menor número de resultados positivos no TCM, o que é compatível com o facto de serem agentes considerados menores e por isso mesmo provocarem pouca inflamação e danos na glândula mamária.

Das culturas negativas, 16,7% apresentaram resultado positivo no TCM, o que significa que podem corresponder a casos de falsos negativos. Estes resultados podem ocorrer devido a: mau acondicionamento da amostra; presença de leucócitos e/ou antibióticos no leite que podem destruir os agentes patogénicos; presença de infecções por *Mycoplasma*, que requerem meios especiais de cultura que não são utilizados de uma forma rotineira; ou no caso de infecções por *E. coli* o microrganismo pode já não se encontrar no leite no momento da recolha, uma vez que o que provoca a sintomatologia clínica nestas mastites são as endotoxinas libertadas aquando da destruição das bactérias pelo sistema imunitário, e não a própria bactéria. No entanto, as 13,5% das vacas que apenas eram positivas ao TCM, mas que não apresentavam mastite, podem ser ainda um indício de um processo inflamatório de origem não infecciosa (Freitas *et al.*, 2005).

Tendo em conta que 50,3% das amostras com presença de agentes apresentaram um resultado positivo no TCM, sem sinais clínicos de mastite, pode concluir-se que nas vacarias participantes se mantém uma elevada prevalência de mastites subclínicas, o que é compatível com os resultados obtidos noutro estudo realizado em Portugal (Bexiga *et al.*, 2005).

No que se refere às resistências aos agentes antimicrobianos, em termos médios os β -lactâmicos foram os fármacos a que os agentes microbianos apresentaram mais resistências, seguindo-se os macrólidos, as cefalosporinas de 1ª geração, os aminoglicosídeos, as lincosamidas, as cefalosporinas de 3ª geração e por fim, a cefalosporina de 2ª geração.

O facto de os β -lactâmicos serem os antibióticos a que os microrganismos apresentaram maiores resistências pode ser explicado pelo facto de algumas bactérias produzirem β -lactamases, hipótese que é suportada pela menor resistência que se verifica na associação amoxicilina e ácido clavulânico.

Dos aminoglicosídeos a estreptomina foi a que apresentou um maior número de resistências, o que é compatível com o estudo realizado anteriormente em Portugal (Nunes *et al.*, 2007).

O facto de as estirpes de *Streptococcus dysgalactiae dysgalactiae* testadas neste estudo não terem apresentado qualquer resistência aos antimicrobianos, está de acordo com o descrito na literatura (Biggs, 2009; Lévesque, 2004; Nunes *et al.*, 2007).

No que se refere às resistências das estirpes de coliformes aos antimicrobianos observou-se que em termos de grupos de antibióticos os β -lactâmicos apresentam uma baixa actividade contra estes agentes, tal como se constatou noutros estudos (Nam *et al.*, 2009; Morin, 2004). Isto pode ser explicado pelo facto de a maioria das enterobacteriaceae produzirem β -lactamases, o que lhes confere uma resistência intrínseca aos β -lactâmicos (Nam *et al.*, 2009). Para além dos β -lactâmicos, também se observou uma grande resistência dos coliformes à espiramicina, o que confirma a resistência dos coliformes aos macrólidos verificada noutro estudo (Morin, 2004).

A sensibilidade das estirpes de *Streptococcus* spp. às penicilinas também se comprovou neste estudo, não tendo sido isolado nenhum destes agentes com resistência à penicilina, o que é compatível com outros estudos (Blowey, 1999). Por outro lado, a resistência à cloxacilina foi bastante superior à registada por Makovec & Ruegg (2003), enquanto que a resistência à eritromicina, lincomicina e pirlimicina foi inferior. No que diz respeito ao trimetoprim e sulfadiazina, a percentagem de resistência foi semelhante à do estudo referido.

Em relação a *Staphylococcus aureus* apenas 20% apresentaram resistência à penicilina, o que é bastante inferior a vários outros estudos efectuados (Andrade, Filho, Mesquita & Rocha, 2000; Makovec & Ruegg, 2003; Izak, Bonazza & Perren, 2007; Pitkälä *et al.*, 2004). Também a resistência deste agente a outros β -lactâmicos foi bastante inferior ao verificado noutros estudos (Moroni *et al.*, 2006; Markovec & Ruegg, 2003).

Das estirpes de SCN isoladas e testadas neste estudo obteve-se muito menor resistência aos antimicrobianos do que o obtido noutros estudos (Izak *et al.*, 2007; Gentilini *et al.*, 2002; Pitkälä *et al.*, 2004). No entanto, de todos os antibióticos utilizados a penicilina é a que os agentes apresentam maiores resistências, o que é compatível com os resultados obtidos nesta literatura.

Enterococcus spp. foram os microrganismos que apresentaram mais resistências aos vários antimicrobianos utilizados, o que está de acordo com o resultado de outros autores (Metzger,

2008; Makovec & Ruegg, 2003; Pitkälä *et al.*, 2004). Uma percentagem muito elevada (93,3%) apresentou resistência à cloxacilina, o que é compatível com o resultado de outro estudo (Makovec & Ruegg, 2003). Em comparação com os resultados obtidos por Makovec e Ruegg (2003), obteve-se uma percentagem de resistências semelhante na cefaloxina e cloxacilina, e uma menor percentagem de resistências à eritromicina, lincomicina, penicilina, pirlimicina e trimetoprim+sulfadiazina. A resistência dos *Enterococcus* spp. às penicilinas pode resultar da produção de proteínas de ligação à penicilina, ou mais raramente, da produção de β -lactamases, enquanto que a resistência aos aminoglicosídeos é provavelmente adquirida e não intrínseca (Pitkälä *et al.*, 2004).

Considerando os agentes responsáveis por mastites de natureza contagiosa neste estudo de caso, verifica-se uma baixa percentagem de agentes resistentes à penicilina e à ampicilina, o que permite a adopção das recomendações dos países nórdicos, que preconizam a administração parenteral de um número muito reduzido de fármacos, preferencialmente penicilina G como método de controlo de mastites (Hillerton & Berry, 2005). Também o uso de bisnagas de seca apenas nos quartos infectados poderá ser um método útil para reduzir a probabilidade de ocorrência de resistências.

De qualquer maneira é importante referir que o reduzido número de isolados das diferentes espécies testadas neste estudo poderá ter originado uma distorção dos resultados, pelo que deverão ser realizados estudos com base numa maior amostragem de microrganismos.

5. Conclusão

Os animais de produção são por vezes acusados de servir como reservatórios de microrganismos resistentes aos antimicrobianos e ainda de servir de meio de disseminação ao ser humano, pelo que o uso de antibióticos deve ser feito com prudência, uma vez que a exposição a qualquer antibiótico produz uma pressão selectiva em favor das bactérias resistentes (Gentilini *et al.*, 2002). Por isso, a constante monitorização dos padrões de resistência é fundamental para a escolha adequada de antimicrobianos, e assim evitar a selecção de estirpes multi-resistentes.

Um dos principais factores que contribuirá para o estabelecimento de medidas adequadas de controlo de mastites é o conhecimento dos perfis de susceptibilidade dos agentes etiológicos, sendo fundamental a realização e publicação de estudos realizados em Portugal. É importante que esses estudos incluam todos os animais da exploração ou uma amostra representativa, não dando hipótese aos produtores de seleccionarem os animais, de modo a não falsear os resultados.

Uma vez conhecido o panorama nacional, será possível que os clínicos responsáveis pelas explorações façam uma escolha fundamentada do antibiótico a utilizar, reduzindo o insucesso terapêutico e, conseqüentemente, a utilização exagerada de antibióticos. No presente trabalho, a pequena amostra de animais analisados e a incerteza de terem sido recolhidas amostras de leite a todos os animais em lactação, coloca algumas reservas quanto a estes resultados. No entanto, foi possível evidenciar alguma tendência quer na percentagem de agentes isolados quer nas resistências encontradas no campo. Deste trabalho, retira-se ainda a conclusão de que uma função importante do médico veterinário é o de explicar aos produtores a importância de incluírem todos os animais nestas acções (provas de estábulo) e de as repetir com uma certa frequência.

6. Referências bibliográficas

- Adkinson, R.W., Ingawa, K.H., Blouin, D.C. & Nickerson, S.C. (1993). Distribution of clinical mastitis among quarters of the bovine udder. *Journal of Dairy Science*, 76, 3453-3459.
- Albornoz, L., Acuña, C.N., Pacheco, M. & Peña, S. (2008). Prevalence of subclinical mastitis in the region of Florida, Uruguay. *NMC 47th Annual Meeting Proceedings, New Orleans, Louisiana, 20-23 January 2008*. pp. 210-211.
- Alluwaimi, A.M (2007). The bovine mammary glands cytokines at the periparturient period. *Scientific Journal of King Faisal University*, 8, 121-130.
- Almeida, A.C., Fonseca, Y.M., Soares, T.M., Silva, D.B., Buelta, T.T. & Silva, G.L. (1999). Tratamento de mastites subclínica em bovinos utilizando bioterapia. *Revista Universitaria Alfenas*, 5, 199-203.
- Almeida, B., Brito, M.A.V., Brito, J.R.F., Pires, M.F.A. & Benites, N.R. (2005). Tratamento de mastite clínica experimental por meio de ordenhas múltiplas em vacas leiteiras inoculadas com *Staphylococcus aureus*. *Arquivo do Instituto Biológico*, 72, 1-6.
- Almeraya, A.P. (1994). Aislamiento de *Prototheca* en un brote de mastitis bovina. *Veterinaria México*, 25, 65-67.
- Andrade, M.A., Filho, F.C.D., Mesquita, A.J. & Rocha, P.T. (2000). Sensibilidade *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. *Ciência Animal Brasileira*, 1, 53-57.
- Archbald, L.F. (1999). Reproductive disease: bovine mastites. In J.L. Howard & R.A. Smith (Ed.). *Current veterinary therapy 4: food animal practice*. (pp. 563-617). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Aslantas, O., Demir, C., Türütoglu, H., Cantekin, Z., Ergün, Y. & Dogruer, G. (2007). Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 31, 253-257.

- Avancini, C., Wiest, J.M., Dall'Agnol, R., Haas, J.S. & Poser, G.L. (2008). Antimicrobial activity of plants used in the prevention and control of bovine mastitis in Southern Brazil. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27, 894-899.
- Bade, D.B., Reinemann, D.J. & Thompson, P.D. (2008). Robot versus human pre-milking teat preparation. *NMC 47th Annual Meeting Proceedings, New Orleans, Louisiana, 20-23 January 2008*. pp. 184-185.
- Bannerman, D.D., Paape, M.J., Goff, J.P., Kimura, K., Lippolis, J.D. & Hope, J.C. (2004). Innate immune response to intramammary infection with *Serratia marcescens* and *Streptococcus uberis*. *Veterinary Research*, 35, 681-700.
- Barkema, H.W., Schukken, H., Lam, T.J.G.M., Beiboer, M.L., Wilmink, H., Benedictus, G. & Brand, A. (1998). Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, 81, 411-419.
- Barkema, H.W., Schukken, H. & Zadoks, R.N. (2006). The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89, 1877-1895.
- Benavides, M.L. & Hemling, T. (2008). The use of teats dips to improve teat condition under South African winter conditions. *NMC 47th Annual Meeting Proceedings, New Orleans, Louisiana, 20-23 January 2008*. pp. 250-251.
- Bexiga, R., Cavaco, L.M. & Vilela, C.L. (2005). Mastites subclínicas bovinas na zona do Ribatejo-Oeste. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 100, 39-44.
- Biggs, A. (2009). *Mastitis in cattle*. Marlborough: The Crowood Press.
- Blowey, R.W. (1999). Mastitis and conditions of the teat and udder. In R.W. Blowey (Ed.). *A veterinary book for dairy farmers*. (3th ed.). (pp. 175-229). Ipswich: Old Pond Publishing.
- Blowey, R. & Edmondson, P. (1999). *Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche*. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A.
- Borm, A.A., Fox, L.K., Leslie, K.E., Hogan, J.S., Andrew, S.M., Moyes, K.M., Oliver, S.P., Schukken, Y.H., Hancock, D.D., Gaskins, C.T., Owens, W.E. & Norman, C. (2006). Effects of prepartum intramammary antibiotic therapy on udder health, milk production, and reproductive performance in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 89, 2090-2098.
- Brechbuehl, M., Stalder, S.M., Albin, S. & Kaufmann, T. (2008). Prevalence of mastitis pathogens in quarter milk samples of dairy cows in Switzerland. *Proceedings of the 25th World Buiatrics Congress, Budapest, Hungary*.
- Britten, A. (2006). Getting the jump on *Mycoplasma* outbreaks. *NMC 45th Annual Meeting Proceedings, Tampa, Florida, 22-25 January 2006*. pp. 212-216.
- Bruckmaier, R.M. & Bulm, J.W. (1998). Oxytocin release and milk removal in ruminants. *Journal of Dairy Science*, 81, 939-949.
- Burton, J.L. & Erskine, R.J. (2003). Immunity and mastitis: some new ideas for an old disease. *The Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 19, 1-45.

- Calvinho, L.F. & Tirante, Y.L. (2005). Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *Revista FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 4, 29-40.
- Capuco, A.V., Wood, D.L., Bright, S.A., Miller, R.H. & Bitman, J. (1990). Regeneration of teat canal keratin in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 73, 1745-1750.
- Capurro, A., Waller, K.P., Aspàn, A., Unnerstad, H.E. & Artursson, K. (2008). Identification of sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. *NMC 47th Annual Meeting Proceedings, New Orleans, Louisiana, 20-23 January 2008*. pp. 222-223.
- Constable, P.D. & Morin, D.E. (2003). Treatment of clinical mastitis using antimicrobial susceptibility profiles for treatment decisions. *The Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 19, 139-155.
- Contreras, G.A. & Sears, P.M. (2008). Use of systemic antibiotic therapy in prepartum heifers to reduce the incidence of intramammary infections. *NMC 47th Annual Meeting Proceedings, New Orleans, Louisiana, 20-23 January 2008*. pp. 252-253.
- Corrêa, I., Corrêa, M.G. & Marin, J.M. (2005). Antimicrobial susceptibility of strains of coagulase-positive *Staphylococcus* isolated from mastitis bovine milk. *ARS Veterinaria*, 21, 69-76.
- Costa, E.O. (2006). Use de antimicrobianos na mastite. In H.S. Spinosa, S.L. Górnaiak & M.M. Bernardi (Ed). *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária* (4^aed.). (pp. 501-515). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.
- Cruppe, L.H., Hoe, F., Franco, F. & Vasconcelos, C. (2008). Characteristic of mastitis agents in Brazilian dairy farms. *NMC 47th Annual Meeting Proceedings, New Orleans, Louisiana, 20-23 January 2008*. pp. 218-219.
- Cuteri, V., Froyman, R., Nisoli, L., Tejeda, A.R., Preziuso, S. & Attili, A. (2008). Field trial in Northern Italy to evaluate the efficacy of two different therapies against acute clinical mastitis in dairy cows. *Proceedings of the 25th World Buiatrics Congress, Budapest, Hungary*.
- Davidson, A.P. & Staberfeldt, G.H. (2007). La glándula mamaria. In J.G. Cunningham & B.G. Klein (Eds). *Fisiología Veterinaria*. (4^a ed.). (pp. 501-514). Madrid: Elsevier.
- Deluyker, H.A., Oye, S.N.V. & Boucher, J.F. (2005). Factors affecting cure and somatic cell count after pirlimycin treatment of subclinical mastitis in lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 88, 604-614.
- DeVries, T.J. & Keyserlingk, M.A.G.V. (2005). Time of feed delivery affects the feeding and lying patterns of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 88, 625-631.
- Dingwell, R.T., Leslie, K.E., Schukken, Y.H., Sargeant, J.M., Timms, L.L., Duffield, T.F., Keefe, G.P., Kelton, D.F., Lissemore, K.D. & Conklin, J. (2004). Association of cow and quarter-level factors at drying-off with new intramammary infections during the dry period. *Preventive Veterinary Medicine*, 63, 75-89.
- Edmondson, P. (2001). Influence of milking machines on mastitis. *Farm Animal Practice*, March, 150-159.

- Elmoslemamy, A.M. & Keefe, G.P. (2008). Risk factory associated with bulk tank milk quality in Prince Edward Island dairy herds. *NMC 47th Annual Meeting Proceedings, New Orleans, Louisiana, 20-23 January 2008*, pp. 238-239.
- Endres, M.I. (2008). Overview of trends in use of manure solids and compost bedded packs. *NMC 47th Annual Meeting Proceedings, New Orleans, Louisiana, 20-23 January 2008*, pp. 136-142.
- Erskine, R.J., Wagner, S. & DeGraves, F.J. (2003). Mastitis therapy and pharmacology. *The Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 19, 109-138.
- Fernández, M.L., Ramírez, J.P., Chaves, C. & Árias, M.L. (2008). Disminución en la incidencia de mastitis en ganado vacuno com la aplicación de un sellador de barrera experimental. *Agronomia Costarricense*, 32, 107-112.
- Fox, L.K. (2006). Mycoplasma mastitis: it just won't go away. *NMC 45th Annual Meeting Proceedings, Tampa, Florida, 22-25 January 2006*. pp. 197-206.
- Fregonesi, J.A., Tucker, C.B. & Weary, D.M. (2007). Overstocking reduces lying time in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90, 3349-3354.
- Freitas, M.F.L., Júnior, J.W., Stamford, T.L.M., Rabelo, S.S., Silva, D.R., Filho, V.M., Santos, F.G.B., Sena, M.J. & Mota, R.A. (2005). Perfil de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no Agreste do estado de Pernambuco. *Arquivo do Instituto Biológico*, 72, 171-177.
- Fuhrmann, T.J. (2002). Quality milk starts with quality management. *National mastitis council annual meeting proceedings*. pp. 131-139.
- Gentilini, E., Denamiel, G., Betancor, A., Rebuelto, M., Fermepin, M.R. & Torres, R.A. (2002). Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. *Journal of Dairy Science*, 85, 1913-1917.
- George, L.W., Divers, T.J., Ducharme, N. & Welcome, F.L. (2008). Diseases of the teats and udder. In T.J. Divers & S.F. Peek. *Rebhun's diseases of dairy cattle*. (2nd ed.). (pp. 327-394). St. Louis: Saunders Elsevier.
- Gerlach, F.A., Álvarez, F.A., Denogean, F.G., Medina, S.M & Gerlach, L.E. (2009). Incidencia y costo de la mastitis en un establo del municipio de Santa Ana, Sonora. *Revista Mexicana Agronegocios*, 24, 789-796.
- Gilson, W.D., Smith, J.W. & Ely, L.O. (2004). Seasonal effects on DHI somatic cell counts. *NMC 43rd Annual Meeting Proceedings, Charlotte, North Carolina, 1-4 February 2004*. pp. 314-315.
- González, R.N. & Wilson, D.J. (2003). Mycoplasmal mastitis in dairy herds. *The Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 19, 199-221.
- González, R.N. (2006). Diagnosing *Mycoplasma* mastitis. *NMC 45th Annual Meeting Proceedings, Tampa, Florida, 22-25 January 2006*. pp. 207-211.

- Graber, H.U. (2008). Bovine mastitis: genotypes of *Staphylococcus aureus* differ in their clinical outcome after intramammary infection. *Proceedings of the 25th World Buiatrics Congress, Budapest, Hungary*.
- Grabowski, N., Hamann, J. & Klein, G. (2008). Udder health and new disease rates in Holstein-Friesian cows in relation to their lactation number. *Proceedings of the 25th World Buiatrics Congress, Budapest, Hungary*.
- Gradle, C. (2008). Teat dips repel flies; their potential relevance in preventing transmission of mastitis pathogens to teat ends. *NMC 47th Annual Meeting Proceedings, New Orleans, Louisiana, 20-23 January 2008*. pp. 246-247.
- Güler, L. & Gündüz, K. (2007). Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from clinical bovine mastitis. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 31, 361-365.
- Hallberg, J.W., Wachowski, M., Moseley, W.M., Dame, K.J., Meyer, J. & Wood, S.L. (2006). Efficacy of intramammary infusion of ceftiofur hydrochloride at drying off for treatment and prevention of bovine mastitis during the nonlactating period. *Veterinary Therapeutics*, 7, 35-42.
- Haynes, N.B. (2001). Diseases caused by bacteria. In N.B. Haynes (Ed.). *Keeping livestock healthy*. (4th ed.). (pp. 141-210). North Adams: Storey Publishing.
- Henton, M.M. (2004). *Klebsiella* spp. Infections. In J. Coetzer & R.C. Tustin (Ed.). *Infectious diseases of livestock*. (2nd ed). (pp.1555-1559). Oxford: Oxford University Press.
- Herremans, T.J. (2006). Practical machine checks and maintenance. *NMC 45th Annual Meeting Proceedings, Tampa, Florida, 22-25 January 2006*. pp. 177-182.
- Hillerton, J.E. & Berry, E.A. (2003). The management and treatment of environmental streptococcal mastitis. *The Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 19, 157-169.
- Hillerton, J.E. & Berry, E.A. (2005). Treating mastitis in the cow – a tradition or an archaism. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1250-1255.
- Izak, E., Bonazza, J.C. & Perren, L.C. (2007). Prevalence and antimicrobial resistance of mastitis pathogens isolated from dairy herds in Argentina. *NMC 46th Annual Meeting Proceedings, San Antonio, 21-24 January 2007*. pp. 248-249.
- Kalorey, D.R., Shanmugam, Y., Kurkure, N.V., Chousalkar, K.K. & Barbuddhe, S.B. (2007). PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases. *Journal of Veterinary Science*, 8, 151-154.
- Kang, S.J., Hur, T.Y., Jung, Y.H., Do, Y.J. & Kim, H.S. (2008). Therapeutic effects of silver ion on clinical mastitis in Holstein cows. *Proceedings of the 25th World Buiatrics Congress, Budapest, Hungary*.
- Kawai, K., Kitou, M., Mitamura, T., Uchida, I., Hirose, K. & Nagahata, H. (2008). Pseudomonas mastitis: elimination from contaminated wash-water system by slightly acidic electrolyzed water. *Proceedings of the 25th World Buiatrics Congress, Budapest, Hungary, 2008*.

- Kochman, A.K., Laney, C. & Spencer, S.B. (2008). Effect of the duration of the c phase of pulsation on milking performance. *NMC 47th Annual Meeting Proceedings, New Orleans, Louisiana, 20-23 January 2008*. pp. 178-179.
- Korhonen, H., Marnila, P. & Gill, H.S. (2000). Milk immunoglobulins and complement factors. *British Journal of Nutrition*, 84, S75-S80.
- Lam, T.J.G.M., Olde R.G.M., Sampimon, O.C. & Smith, H. (2009). Mastitis diagnostics and performance monitoring: a practical approach. *Irish Veterinary Journal*, 62, 34-39.
- Leemput, E.S.V. & Zadoks, R.N. (2006). Macrolide and lincosamide resistance in *Streptococcus uberis*. *NMC 45th Annual Meeting Proceedings, Tampa, Florida, 22-25 January 2006*. pp. 274-275.
- Leitner, G., Krifucks, O., Jacoby, S., Lavi, Y. & Silanikove, N. (2008). Health status of cows before parturition associated with concentration of GM1 & IgG in colostrum and reflects resistance of acquiring new IMI at early lactation. *Proceedings of the 25th World Buiatrics Congress, Budapest, Hungary*.
- Leslie, K.E. (2004). New concepts on bovine mastitis control. *23rd World Buiatrics Congress, Québec, Canada, 11-16 July 2004*.
- Lévesque, P. (2004). *Less Mastitis: Better milk*. Canada: Hoard's Dairyman.
- Locatelli, C., Scaccabarozzi, L., Casula, A., Gorrieri, F., Harouna, A. & Moroni, P. (2008). Manure solids bedding as a source of clinical environmental mastitis. *NMC 47th Annual Meeting Proceedings, New Orleans, Louisiana, 20-23 January 2008*. pp. 224-225.
- Lombard, J., Slyke, T.V., Welcome, F., Schukken, Y. & Kopral, C. (2008). Prevalence of contagious mastitis pathogens on U.S. dairy operations. *NMC 47th Annual Meeting Proceedings, New Orleans, Louisiana, 20-23 January 2008*. pp. 170-171.
- Makovec, J.A. & Ruegg, P.L. (2003). Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8,905 samples (1994-2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222, 1582-1589.
- Marques, S., Silva, E., Kraft, C., Huss, V. & Thompson, G. (2008). *Prototheca blaschkeae* associated with bovine mastitis. *Proceedings of the 25th World Buiatrics Congress, Budapest, Hungary, 2008*.
- Mehrzhad, J., Garoussi, M.T., Rad, A.H.F., Farzaneh, N. & Hashemitabar, G. (2008). Mammary gland immune dysfunction in high yielding dairy cows immediately after calving: can dietary vitamin C help?. *Proceedings of the 25th World Buiatrics Congress, Budapest, Hungary*.
- Metzger, S. (2008). *Biofilm formation by Enterococcus species of bovine mammary gland and environmental origins*. Honors thesis. Ohio: Department of Animal Sciences, The Ohio State University.
- Morin, D.E. (2004). Acute mastitis: revisiting the goals of therapy. *Proceedings of the 23rd World Buiatrics Congress, Québec, Canada, 11-16 July 2004*.

- Moroni, P., Pisoni, G., Antonini, M., Villa, R., Boettcher, P. & Carli, S. (2006). Susceptibilidade às drogas antimicrobianas de *Staphylococcus aureus* oriundos de mastites bovinas subclínicas na Itália. *Journal of Dairy Science*, 89, 2973-2976.
- Müller, E.E. (2002). Qualidade do leite, células somáticas e prevenção de mastite. *Leite: Simpósio sobre sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil*, 206-217.
- Munoz, M.A., Ahlström, C., Rauch, B.J. & Zadoks, R.N. (2006). Fecal shedding of *Klebsiella pneumoniae* by dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89, 3425-3430.
- Nam, H.M., Lim, S.K., Kang, H.M., Kim, J.M., Moon, J.S., Jang, K.C., Kim, J.M., Joo, Y.S. & Jung, S.C. (2009). Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. *Journal of Dairy Science*, 92, 2020-2026.
- Nickerson, S.C., Owens, W.E. & Boddie, R.L. (1995). Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control. *Journal of Dairy Science*, 78, 1607-1618.
- Nunes, S.F., Cavaco, L.M., Vilela, C.L., Bexiga, R. (2007). Perfil de susceptibilidade a antibióticos de agentes etiológicos de mastite subclínica bovina em Portugal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 102, 275-280.
- Nyman, A.K. (2007). *Epidemiological studies of risk factors for bovine mastitis*. Doctoral thesis. Uppsala: Department of Clinical Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Nyman, A.K., Ekman, T., Emanuelson, U., Gustafsson, A.H., Holtenius, K., Waller, K.P. & Sandgren, C.H. (2007). Risk factors associated with the incidence of veterinary-treated clinical mastitis in Swedish dairy herds with a high milk yield and a low prevalence of subclinical mastitis. *Preventive Veterinary Medicine*, 78, 142-160.
- O'Callaghan, E.J. (1996). Measurement of liner slips, milking time and milk yield. *Journal of Dairy Science*, 79, 390-395.
- Oliveira, L., Rodrigues, A.C., Hulland, C. & Ruegg, P. (2008). Genetic diversity and expression of enterotoxin of *Staphylococcus aureus* associated with bovine mastitis. *NMC 47th Annual Meeting Proceedings, New Orleans, Louisiana, 20-23 January 2008*. pp. 192-193.
- Oliver, S.P., Luther, D.A., Park, H.M. & Almeida, R.A. (2004). SUAM: an important virulence factor in the pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis. *NMC 43rd Annual Meeting Proceedings, Charlotte, North Carolina, 1-4 February 2004*. pp. 353-354.
- Ollis, G. & Schoonderwoerd, M. (1989). Subclinical mastitis associated with *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens*. *The Canadian Veterinary Journal*, 30, 525.
- O'Rourke, D. (2009). Nutrition and udder health in dairy cows: a review. *Irish Veterinary Journal*, 62 (supplement), 15-20.
- Pantoja, J. & Ruegg, P. (2007). Somatic cell count and incidence of new intramammary infection across lactations. *NMC 46th Annual Meeting Proceedings, San Antonio, Texas, 21-24 January 2007*. pp. 226-227.

- Paulrud, C.O. (2005). Basic concepts of the bovine teat canal. *Veterinary Research Communications*, 29, 215-245.
- Pedrini, S.C.B. & Margatho, L.F.F. (2003). Sensibilidade de microrganismos patogénicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. *Arquivo do Instituto Biológico*, 70, 391-395.
- Philpot, W.N. & Nickerson, S.C. (1991). *Mastitis: counter attack – a strategy to combat mastitis*. Illinois: Babson Bros. Co.
- Piepers, S., Barkema, H.W., Kruif, A., Opsomer, G. & Vlieghe, S.D. (2008). Association between CNS-infections at calving and first lactation milk production and somatic cell counts in dairy heifers. *NMC 47th Annual Meeting Proceedings, New Orleans, Louisiana, 20-23 January 2008*. pp. 172-173.
- Pighetti, G.M. (2006). Selecting for disease resistance: fact or fiction? *NMC 45th Annual Meeting Proceedings, Tampa, Florida, 22-25 January 2006*. pp. 97-102.
- Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Myllys, V. & Buzalski, T.H. (2004). Bovine mastitis in Finland 2001 – prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *Journal of Dairy Science*, 87, 2433-2441.
- Pullinger, G.D., Benavides, M.L., Coffey, T.J., Williamson, J.H., Cursons, R.T., Summers, E., Hulbert, J.L., Maiden, M.C. & Leigh, J.A. (2006). Application of *Streptococcus uberis* multilocus sequence typing: analysis of the population structure detected among environmental and bovine isolates from New Zealand and the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1429-1436.
- Pyörälä, S. (2002). New strategies to prevent mastitis. *Reproduction in Domestic Animals*, 37, 211-216.
- Pyörälä, S. (2009). Treatment of mastitis during lactation. *Irish Veterinary Journal*, 62, 40-44.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C. & Hinchcliff, K.W. (2000). Mastitis. In O.M. Radostits, C.C. Gay, D.C. Blood, K.W. Hinchcliff (Ed.). *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. (9th ed.). (pp. 603-691). Edinburgh: W. B. Saunders Company Ltd.
- Rainard, P. (2003). The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Veterinary Research*, 34, 647-670.
- Rasmussen, M.D., Ronningen, O. & Bjerring, M. (2008). Milking time test: interpretation of results. *NMC 47th Annual Meeting Proceedings, New Orleans, Louisiana, 20-23 January 2008*. pp. 182-183.
- Ravaomanana, J., Rasambainarivo, A., Perrot, A., Razafiarison, O. & Rakotonindrina, S. (2004). Mastitis in dairy cows and its economic impact in smallholder production in the Highland Zones of Madagascar. *Proceedings of the 11th International Conference of the Association of Institutions of Tropical Veterinary Medicine, Kuala Lumpur, Malásia*.
- Reneau, J.K. (1986). Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control. *Journal of Dairy Science*, 69, 1708-1720.

- Reyes, C. & Mellano, M. (1994). Occurencia de desordenes derivados del parto y mastitis en vacas Holstein, en funcion del número de partos y meses del año. *Veterinaria Mexicana*, 25, 133-135.
- Ribeiro, M.G., Motta, R.G., Paes, A.C., Allendorf, S.D., Salerno, T., Siqueiro, A.K., Fernandes, M.C. & Lara, G.H.B. (2008). Peracute bovine mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnica*, 60, 485-488.
- Riekerink, R.O., Barkema, H., Poole, D., Kelton, D. & Scholl, D. (2007a). Risk factors for incidence rate of clinical mastitis in a nationwide study on Canadian dairy farms. *NMC 46th Annual Meeting Proceedings, San Antonio, Texas, 21-24 January 2007*. pp. 204-205.
- Riekerink, R.O., Barkema, H. & Stryhn, H. (2007b). The effect of season on somatic cell count and the incidence of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 90, 1704-1715.
- Riekerink, R.O., Barkema, H.W., Kelton, D.F. & Scholl, D.T. (2008). Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 91, 1366-1377.
- Roberson, J.R. (2003). Establishing treatment protocols for clinical mastitis. *The Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 19, 223-234.
- Roberson, J.R. (2008). Mastitis: viral. In S.R.R. Haskell (Ed.). *Blackwell's five-minute veterinary consult: ruminant*. (pp. 546-547). Iowa: Blackwell Publishing.
- Roy, J.P., DesCoteaux, L., DuTremblay, D. & Beaudry, F. (2008). Efficacy of a 5-day extended lactational therapy with cephapirin sodium in dairy cows chronically infected with *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the 25th World Buiatrics Congress, Budapest, Hungary*.
- Ruegg, P.L. (2003). Investigation of mastitis problems on farms. *The Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 19, 47-73.
- Ruhnke, H.L., Thawley, D. & Nelson, F.C. (1976). Bovine Mastitis in Ontario due to *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis*. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 40, 142-148.
- Saeman, A.I., Verdi, R.J., Galton, D.M. & Barbano, D.M. (1988). Effect of mastitis on proteolytic activity in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 71, 505-512.
- Santos, E.M., Brito, M.A., Lange, C., Brito, J.R. & Cerqueira, M.M. (2007). *Streptococcus* e géneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina. *Acta Scientiae Veterinariae*, 35, 17-27.
- Scaccabarozzi, L., Turchetti, B., Pisoni, G., Buzzini, P. & Moroni, P. (2007). Environmental sources of *Prototheca spp.* in a dairy herd in Italy. *NMC 46th Annual Meeting Proceedings, San Antonio, Texas, 21-24 January 2007*. pp. 256-257.
- Scaletti, R.W., Trammel, D.S., Smith, B.A. & Harmon, R.J. (2003). Role of dietary copper in enhancing resistance to *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 86, 1240-1249.

- Scaramelli, A.M., Ferrano, L. & Troya, H. (1999). Recuento electrónico de células somáticas aplicado a la detección de mastitis subclínica bovina en fincas lecheras de los estados Aragua y Carabobo, Venezuela. *Revista Científica*, 9, 508-518.
- Schreiner, D.A., Ruegg, P.L. (2003). Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 86, 3460-3465.
- Schukken, Y.H., Wilson, D.J., Welcome, F., Tikofsky, L.G. & Gonzalez, R.N. (2003). Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Veterinary Research*, 34, 579-596.
- Schukken, Y.H., Zadoks, R.N., Tikofsky, L., Dogan, B., Klaessig, S., Simpson, K., Wiedmann, M. & Boor, K. (2004). Epidemiology of mastitis: paradigms, pattern and parables. *Proceedings of the 23rd WBC Congress, Québec, Canada, 11-16 July 2004*.
- Sears, P.M. & McCarthy, K.K. (2003). Management and treatment of staphylococcal mastitis. *The Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 19, 171-185.
- Seegers, H., Billon, D., Roussel, P., Serieys, F. & Bareille, N. (2008). Economic assessment of selective versus blanket dry cow treatment options including teat sealer use. *Proceedings of the 25th World Buiatrics Congress, Budapest, Hungary*.
- Shwimmer, A., Freed, M., Blum, S., Khabit, N., Weissblit, L., Friedman, S. & Elad, D. (2007). Mastitis caused by *Yersinia pseudotuberculosis* in Israeli dairy cattle and public health implications. *Zoonoses and Public Health*, 54, 353-357.
- Sisson, S. (1986). Aparelho urogenital do ruminante – órgãos genitais femininos. In R. Getty. *Sisson/Grossman Anatomia dos animais domésticos* (5^a ed). (pp. 887-895). (volume I). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Smith, K.L. & Hogan, J.S. (2006). Bedding counts in manure solids. *NMC 45th Annual Meeting Proceedings, Tampa, Florida, 22-25 January 2006*. pp. 161-167.
- Sordillo, L.M., Shafer-Weaver, K. & Derosa, D. (1997). Immunobiology of the mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 80, 1851-1865.
- Sousa, J.M.B. (2008). *A hiperqueratose do canal do teto nas explorações leiteiras portuguesas. Causas e efeitos microbiológicos*. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Srinivasan, V., Sawant, A.A., Gillespie, B.E., Headrick, S.I., Ceasar, L. & Oliver, S.P. (2006). Characterization of enterotoxin and toxic shock syndrome genes in *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. *NMC 45th Annual Meeting Proceedings, Tampa, Florida, 22-25 January 2006*. pp. 230-231.
- Taponen, S. & Pyörälä, S. (2007). How important is coagulase-negative Staph as a cause of mastitis? *NMC 46th Annual Meeting Proceedings, San Antonio, Texas, 21-24 January 2007*. pp. 81-91.
- Teixeira, P., Ribeiro, C. & Simões, J. (2008). Prevenção de mamites em explorações de bovinos leiteiros. Acedido em Março 3, 2010, disponível em: <http://www.veterinaria.com.pt/>.

- Thorberg, B.M. (2008). *Coagulase-negative Staphylococci in bovine sub-clinical mastitis*. Licentiate Thesis in Biomedical Sciences and Veterinary Public Health. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences.
- Tirian, A., Kovács, M., Brydl, E., Szenci, O., Könyves, L., Jurkovich, V. & Ungvári, E. (2008). *Staphylococcus aureus* mastitis in fresh calved heifers on a dairy farm in Hungary. *Proceedings of the 25th World Buiatrics Congress, Budapest, Hungary, 2008*.
- Tyler, J.W. & Cullor, J.S. (2002). Mammary gland health and disorders. In B.P. Smith (Ed.). *Large animal internal medicine*. (3rd ed.). (pp. 1019-1038). St. Louis: Mosby, Inc.
- Todhunter, D.A., Smith, K.L. & Hogan, J.S. (1991). *Serratia* species isolated from bovine intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, 74, 1860-1865.
- Tozzetti, D.S., Bataier, M.B., Almeida, L.R. & Piccinin, A. (2008). Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 10.
- Voltini, T.V., Santos, G.T, Zambom, M.A, Ribas, N.P., Müller, E.E., Damasceno, J.C., Ítavo, L.C.V. & Veiga, D.R. (2001). Influência dos estádios de lactação sobre a contagem de células somáticas do leite de vacas da raça holandesa e identificação de patógenos causadores de mastite no rebanho. *Acta Scientiarum*, 23, 961-966.
- Yamamura, A.A.M., Müller, E.E., Giardano, L.G.P., Cosenza, M., Silva, P.F.N. & Godoy, A. (2007). Isolamento de *Prototheca* spp. de vacas com mastite, de leite de tanques de expansão e do ambiente dos animais. *Ciências Agrárias, Londrina*, 28, 105-114.
- Yousaf, A., Muhammad, G., Rahman, S., Siddique, M. & Masood, M.Z. (2009). Effect of montanide adjuvanted *Staphylococcus aureus* bacterin-toxiod on prevalence and incidence of mastitis in cows. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 46, 119-123.
- Wang, H. & Hurley, W.L. (1998). Identification of lactoferrin complexes in bovine mammary secretions during gland involution. *Journal of Dairy Science*, 81, 1896-1903.
- Watts, J.L. (1988). Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 16, 41-66.
- Wilson, D.J., Gonzalez, R.N., Case, K.L., Garrison, L.L. & Gröhn, Y.T. (1999). Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*, 82, 1664-1670.
- White, D.G., Cray, P.F. & Chiller, T.C. (2006). The national antimicrobial resistance monitoring system (NARMS). *NMC 45th Annual Meeting Proceedings, Tampa, Florida, 22-25 January 2006*. pp. 56-60.
- Zadoks, R.N. & Schukken, Y.H. (2003). *Streptococcus uberis*: environmental or contagious pathogen? *NMC 42nd Annual Meeting Proceedings, Fort Worth, Texas, 26-29 January 2003*. pp. 61-67.
- Zadoks, R. & Munoz, M. (2007). The emergence of *Klebsiella* as a major mastitis organism. *NMC 46th Annual Meeting Proceedings, San Antonio, Texas, 21-24 January 2007*. pp. 100-111.

- Zadoks, R., Griffiths, H., Munoz, M., Bennett, G., Thomas, E. & Schukken, Y. (2008). *Klebsiella* in feces of dairy cattle – where does it come from? *NMC 47th Annual Meeting Proceedings, New Orleans, Louisiana, 20-23 January 2008*. pp. 242-243.
- Zadoks, R., Munoz, M., Griffiths, H., Bennett, G. & Schukken, Y. (2008). *Klebsiella* – not by bedding alone. *NMC 47th Annual Meeting Proceedings, New Orleans, Louisiana, 20-23 January 2008*. pp. 240-241.
- Zadoks, R.N. & Fitzpatrick, J.L. (2009). Changing trends in mastitis. *Irish Veterinary Journal*, 62, 59-70.
- Zafalon, L.F., Filho, A.N., Oliveira, J.V. & Resende, F.D. (2007). Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia*, 59, 577-585.
- Zecconi, A. (2006). Can we eradicate *Staphylococcus aureus* mastitis? *XXIV World Buiatrics Congress, Nice, France*.
- Zdanowicz, M., Shelford, J.A., Tucker, C.B., Weary, D.M. & Keyserling, M.A.G.V. (2004). Bacterial populations on teat ends of dairy cows housed in free stalls and bedded with either sand or sawdust. *Journal of Dairy Science*, 87, 1694-1701.

Anexo I – Casuística total do Estágio Curricular

Tabela 1: Casuística em bovinos adultos (aparelho digestivo e alterações metabólicas)

Bovinos	
Situação	Nº de casos
Deslocamento do abomaso à esquerda	29
sem cirurgia	10
com cirurgia	19
Deslocamento do abomaso à direita	8
com torção	2
sem torção	6
Diarreia	5
Cólica abdominal	1
Úlcera do abomaso	3
Estase ruminal	20
Timpanismo espumoso	1
Dilatação do ceco	1
Peritonite	2
Hipocalcemia	16
Cetose	18
Reticulo pericardite traumática	3
Cólica renal	1
Fígado gordo	8
Actinomicose	1
Quistos ováricos	22
Pneumovagina	2
Urovagina	5
Infertilidade	13
Cesariana	2
Metrite	31
Retenção placentária	16
Observação antes do parto	1
Prolapso uterino	3
Distócia	11
Indução do parto	10
Freemartinismo	3
Retroperitonite	3
Piometra	1
Laceração da vulva	1
Feto mumificado	1

Tabela 2: Casuística em bovinos adultos (continuação)

Situação	Nº de casos
Mastites	43
indeterminada	20
colibacilar	17
gangrenosa	1
traumática	5
Vaca caída	42
lesão obturadores	10
lesão peroneal	7
Lesão ciático	3
lesão gastrocnémio	2
Luxação ombro	1
Fractura do MP	4
mamite colibacilar	4
hipocalcémia	11
Patologia podal	10
Lesão muscular	3
Malformação na pata	1
Pneumonia	7
Meningite	1
Papilomatose	3
Limpeza de ferida	1
Abcesso na veia mamária	2
Eutanásia	14
Necrópsia	1
Vacinação	112
Total	355

Tabela 3: Casuística em vitelos

Vitelos	
Situação	Nº de casos
Desidratação	1
Desparasitação	17
Diarreia	8
Indigestão láctea	5
Dores musculares	1
Hérnia umbilical	
com cirurgia	1
Artrite séptica	1
Otite	1
Onfalite	1
Pneumonia	9
Cólica renal	1
Queda	1
Coccidiose	1
Total	48

Tabela 4: Casuística em pequenos ruminantes

Pequenos ruminantes	
Situação	Nº de casos
Prolapso vaginal	1
Anemia	7
Paralisada	1
Mordedura	1
Pneumonia	5
Agalaxia	1
Prolapso uterino	1
Toxemia de gestação	1
Lesão muscular	1
Eutanásia	1
Aborto	2
Total	22

Tabela 5: Casuística em suínos

Porcos	
Situações	Nº de casos
Indigestão	10
Febre	6
Doença dos edemas	28
MMA	8
Prolapso rectal	1
Dermatite exsudativa (leitões)	34
Administração de ferro (leitões)	43
Diarreia	36
Mal rubro	8
Lesões muscular	4
Vacinação	2
Psoríase rósea (leitões)	20
Fractura do membro	2
Otohematoma	1
Lombomialgia	1
Parto distócico	4
Aborto	1
Pneumonia	1
Castração	1
Meningite	1
Total	212

MMA – mamite metrite agalaxia

Tabela 6: Casuística em equídeos

Equídeos	
Situações	Nº de casos
Pulmoeira	3
Sarna	1
Total	4

Tabela 7: Casuística em pequenos animais

Pequenos animais		
Situações		Nº de casos
Lesões musculares		1
Vacinação		5
Coelho com sarna		1
Micose		1
OVH	gatas	5
	cadelas	1
Eutanásia		2
Neoplasia mamária		1
Total		17

OVH – ovariectomia

Anexo II – Tabelas da correlação de Spearman

Tabela 1 – Correlação de Spearman entre dia de lactação e presença de agente

Correlations			Dia_lact	Agente
Spearman's rho	Dia_lact	Correlation Coefficient	1,000	,053
		Sig. (2-tailed)	.	,389
		N	268	268
	Agente	Correlation Coefficient	,053	1,000
		Sig. (2-tailed)	,389	.
		N	268	268

Tabela 2 – Correlação de Spearman entre número de lactação e presença de agente

Correlations			n_lact	c_agente
Spearman's rho	n_lact	Correlation Coefficient	1,000	,188**
		Sig. (2-tailed)	.	,002
		N	268	268
	c_agente	Correlation Coefficient	,188**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,002	.
		N	268	268

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Tabela 3 – Regressão linear (presença de agente em função do número de lactação)

Coefficients ^a					
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	Sig.
		B	Std. Error	Beta	
1	(Constant)	,598	,057		10,496
	n_lact	,050	,018	,165	2,730

a. Dependent Variable: c_agente